

Elektrophoretische und immunologische
Untersuchungen
am menschlichen Nierenkarzinom

Alois Stiegelmayr

Diss
München
1964

Aus dem Institut für Zellbiologie
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. F. Miller

Elektrophoretische und immunologische Untersuchungen
am menschlichen Nierenkarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alois Stiegelmayr

aus
Augsburg

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

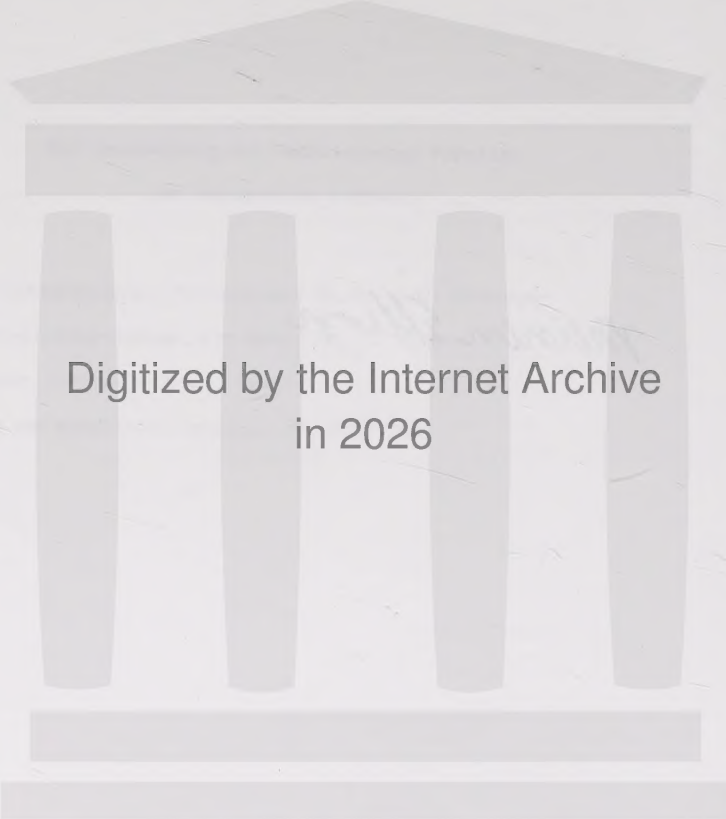
Berichterstatter: Privatdozent Dr.Dr. G.D. Birkmayer

Mitberichterstatter: Professor Dr. F. Miller

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1984

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0009

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG UND PLAN	3
3. UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODEN	9
3.1. Untersuchungsgut	9
3.2. Aufbereitung der Nieren	9
3.2.1. Homogenisieren und Waschen des Nieren- gewebes	9
3.2.2. Auftrennung in Zellbestandteile	10
3.2.3. Lösen von Proteinen aus den durch dif- ferentielles Zentrifugieren gewonnenen subzellulären Fraktionen S1, S2, S3, S5 und S6	10
3.3. Aufbereitung der Seren	12
3.3.1. Gewinnung der Seren aus Vollblut	12
3.3.2. Herstellen der Immunglobulinfraktion	12
3.4. Proteinkonzentrationsbestimmung	13
3.5. Elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben	13
3.5.1. Polyacrylamidgel - Elektrophorese mit SDS	13
3.5.1.1. Probenvorbereitung	13
3.5.1.2. Herstellen von Polyacrylamidgelen	14
3.5.1.3. Elektrophorese	21
3.5.1.4. Färben der Gele	22
3.5.2. Isoelektrofokussieren in Polyacrylamid- rundgelen	23
3.5.2.1. Probenvorbereitung	23
3.5.2.2. Herstellen der Gele	23
3.5.2.3. Elektrophorese	24
3.5.2.4. Fixieren und Färben	26
3.5.3. Densitometrische Auswertung von Rundge- len	26
3.6. Immunologische Untersuchungsmethoden	26
3.6.1. Herstellen der Agarosegele	26
3.6.2. Immundoppeldiffusion	27
3.6.3. Gegenstromelektrophorese	27

3.6.4.	Mikro-Immundoppeldiffusion und Mikro-Gegenstromelektrophorese	30
3.6.5.	Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von Präzipitaten	30
3.7.	Kombination von SDS PAGE und Immunelektrophorese	31
3.7.1.	SDS PAGE	31
3.7.2.	Herstellen des Agarosegeles	31
3.7.3.	Immunelektrophorese	32
3.8.	Kombination von IFPAG und Immunelektrophorese	34
3.8.1.	IFPAG	34
3.8.2.	Herstellung des Agarosegeles	34
3.8.3.	Immunelektrophorese	34
3.9.	Kombination von Gegenstromelektrophorese und SDS PAGE	34
3.9.1.	Gegenstromelektrophorese	34
3.9.2.	Vorbereitung der Agarosegele für die SDS PAGE	35
3.9.3.	SDS PAGE	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1.	Bezeichnung der Seren und Proteinproben	36
4.2.	Elektrophoretische Untersuchung der aus Nieren Gesunder und Karzinomen extrahierten Proteine	37
4.2.1.	Ergebnisse des IFPAG	37
4.2.2.	Ergebnisse der SDS PAGE	42
4.3.	Immunologische Untersuchungen	54
4.3.1.	Immundoppeldiffusion	54
4.3.2.	Gegenstromelektrophorese	61
4.3.3.	Mikroimmundoppeldiffusion und Mikro-gegenstromelektrophorese	63
4.3.4.	Immunfluoreszenzmarkierung von Präzipitaten aus der Gegenstromelektrophorese	63
4.4.	Elektrophoretische Untersuchung von Immunpräzipitaten	75

4.4.1.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinproben und anschließende Immunelektrophorese	75
4.4.1.1.	SDS PAGE und Immunelektrophorese	75
4.4.1.2.	IFPAG und Immunelektrophorese	75
4.4.2.	Auftrennung von Präzipitaten aus der Gegenstromelektrophorese in der SDS PAGE	79
5.	DISKUSSION	90
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
7.	LITERATURVERZEICHNIS	112

1. Z U S A M M E N F A S S U N G

Tumor- und Normalanteil von 5 karzinombefallenen menschlichen Nieren sowie eine gesunde Niere wurden durch differentiell Zentrifugieren in je 7 subzelluläre Fraktionen aufgetrennt und aus jeder Fraktion PBS-lösliche und Triton-X-100-lösliche Proteine isoliert.

Proteinproben von 3 Tumornieren und der gesunden Niere wurden gemäß ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und ihre Bandenmuster verglichen. Es zeigten sich sowohl Unterschiede zwischen Tumor- und Normalanteil als auch zwischen gesunder Niere und Tumor- und Normalanteil. Eindeutig tumorassoziierte Banden ließen sich jedoch nicht erkennen.

Mit Immundoppeldiffusion und Gegenstromelektrophorese wurde nach Antigenen in den Proteinproben der 5 Nierenkarzinome gesucht. Als Antiseren dienten 5 autologe und 7 homologe Seren von Nierenkarzinompatienten sowie 5 Seren von Probanden mit anderen Erkrankungen und Gesunden, die als Kontrollgruppe dienten. 4 der 5 autologen Seren bildeten Immunpräzipitate mit Antigenen aus ihrem Tumor. In homologen Seren fanden sich ebenfalls präzipitierende Antikörper gegen Nierenkarzinomantigene. Die Häufigkeit der Reaktionen und die Fraktionen, in denen sich die entsprechenden Antigene nachweisen ließen, variierten von Niere zu Niere. Nicht jedes homologe Serum reagierte mit jedem Nierenkarzinom. Auch in Seren der Kontrollgruppe fanden sich gelegentlich präzipitierende Antikörper gegen Antigene aus Tumornieren. Präzipitate traten häufiger gegen Triton-X-100-lösliche Proteine auf und waren deutlicher gegen Proben aus dem Normalanteil festzustellen. Es ergaben sich Hinweise, daß nach Tumoresektion die Antikörper gegen Nierenkarzinomantigene vorübergehend ansteigen. Die Identität der an den Immunreaktionen beteiligten Antigene konnte nicht nachgewiesen werden.

Zu ihrer elektrophoretischen Charakterisierung wurden 2 Wege eingeschlagen:

1. Mit Hilfe der 2-dimensionalen Immunelektrophorese wurde untersucht, ob die gemäß ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Proteine Immunpräzipitate mit Antikörpern aus Patientenserum bilden. Die Ergebnisse ließen keine sichere Aussage zu.
2. Immunpräzipitate aus der Gegenstromelektrophorese von Triton-X-100-löslichen Proteinen aus dem Normalanteil einer tumorbefallenen Niere (9N1X) mit Patientenserum (9N1X bildete mit autologem Serum, allen Nierenkarzinompatientenserum und nur einem Serum aus der Kontrollgruppe Präzipitate) wurden gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Wahrscheinlich hatten die Antigene aus den Immunpräzipitaten ein ähnliches Molekulargewicht, wie die daran beteiligten Serumproteine (um 60.000 Dalton) und wurden deshalb von ihnen überlagert.

2. E I N L E I T U N G U N D P L A N

Eine wichtige Eigenschaft der Tumorzelle ist es, daß sie den interzellulären Regulierungsmechanismen nicht mehr gehorcht, die das Verhältnis zwischen Einzelzelle und Zellverband, ihre Differenzierung und Vermehrung bestimmen. Vor allem die ungehemmte Zellteilung und ihre Unabhängigkeit vom Zellverband aus dem sie hervorgeht, ihre Autonomie, führt zur Zerstörung des Organismus. Oft entstehen im Tumor selbst Nekrosen, da wegen des schnellen und ungeordneten Wachstums eine ausreichende Versorgung über Blutgefäße nicht mehr gewährleistet werden kann.

Um die Ursachen für diese Entartung zu finden, werden Veränderungen im genetischen Informationsmaterial, im Zellstoffwechsel und in zellulären Strukturen untersucht. Alle 3 sind eng miteinander verbunden. Veränderungen im Genom der Zelle rufen Veränderungen in Struktur und Stoffwechsel hervor und diese können über Rückkopplung eine Kontrolle auf das genetische Informationsmaterial ausüben.

Im Bereich genetischer Untersuchungen steht neben der Beschreibung von Kernmorphologie und anormalen Chromosomen die Forschung auf molekularer Ebene im Vordergrund. Bei virusinduzierten tierischen Tumoren kann die genetische Information des tumorauslösenden Virus in den Chromosomen der Tumorzelle nachgewiesen werden (Warnatz 1975). Der Verlust von Genen aus dem Histokompatibilitätskomplex kann die Fähigkeit des Tumors zu ungehindertem Wachstum und Metastasierung beeinflussen (Hämmerling 1984). Die Lokalisation des Genortes verschiedener tumorassoziierter Proteine ist möglich (Plowmann e.a. 1983). Letztlich wird in der tumorgenetischen Forschung nach Genen gesucht, die die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle bewirken, den Onkogenen (Cooper 1982).

Da die Proliferation von Zellen unter anderem über ihre Zellmembran, die Kontaktzone zum umgebenden Gewebe reguliert wird und ungehemmte Proliferation ein wichtiges Merkmal der Tumorzelle ist, müßte die Manifestation dieser Onkogene sich auch an der Zelloberfläche zeigen.

Zelloberflächenstrukturen können vom Immunsystem des Organismus erkannt werden. Treten Veränderungen ein, die von ihm als "nicht selbst" erkannt werden, so bildet sich in der Regel eine Abwehrreaktion gegen dieses fremde Antigen aus.

Solche Zelloberflächenveränderungen wurden eng verbunden mit der Erforschung der Histokompatibilitätsantigene zuerst in allogenen Transplantationsversuchen bei tierischen Tumoren untersucht. Die dabei auftretenden Abstoßungsreaktionen waren aber zum größten Teil durch Alloantigene und nicht durch tumorspezifische Transplantationsantigene verursacht. Erst mit der Einführung genetisch genau definierter Inzuchtstämme und ihrer Hybride (Snell 1952) sind verfälschende Einflüsse von nicht tumorassoziierten Transplantationsantigenen ausgeschaltet worden (Prehn u. Main 1957). Abstoßungsreaktionen sind bei chemisch induzierten und virusinduzierten Tumoren (Gross 1943, Prehn u. Main 1957, Klein 1966), seltener bei spontan auftretenden Tumoren (Hewitt 1976) gefunden worden.

Beim Menschen, an dem Transplantationsversuche nicht möglich sind, können Lymphozyteninfiltration, Spontanremission, verzögertes Tumorwachstum, Rückbildung von Metastasen nach Tumorresektion und vermehrtes Auftreten von Tumoren nach Behandlung mit Immunsuppressiva als indirekte klinische Hinweise für eine Immunantwort auf einen Tumor angesehen werden (Benjamini e. a. 1982). Genauere Aussagen über das Verhältnis Tumor-Organismus sind beim Menschen schwer zu treffen, da Einflüsse von Histokompatibilitäts- und anderen Antigenen nur im gleichen Individuum weitgehend ausgeschlossen wer-

den können.

Die zelluläre Immunabwehr spielt eine wichtige Rolle bei der Auseinandersetzung des Organismus mit dem Tumor. Ihre Reaktionsmechanismen lassen sich einigermaßen überschaubar nur *in vitro* darstellen. Dabei sind die Zytotoxizität von Lymphozyten gegen Tumorzellen (Takasugi u. Klein 1970) und die Hemmung oder Stimulation von Lymphozyten-, Leukozyten- oder Makrophagenwanderung (Kaddish e. a. 1976, Adams e. a. 1976) *in vitro* meßbare Parameter für die zelluläre Immunreaktion gegen Tumorzellen. Man muß jedoch bedenken, daß sie nur Teilaspekte des Ablaufs im Organismus isoliert darstellen und ihre Korrelation zur Immunreaktion im Organismus noch nicht völlig geklärt ist.

Daneben existiert eine humorale Immunantwort des Organismus gegen seinen Tumor. Zirkulierende Antikörper gegen Tumorantigene, Antigen-Antikörper-Komplexe (Theofilopoulos u. Dixon 1979) und an die Tumorzelle adsorbierte Antikörper (Irie e. a. 1975) weisen darauf hin.

Um Tumorantigene zu finden, die eine Immunantwort auslösen, werden Tumorzellen mit serologischen Methoden nach spezifischen Antigenen abgetastet. Man geht dabei in der Weise vor, daß Tiere zuerst mit Zellen oder Zellbestandteilen eines Tumors immunisiert werden. Spezifische Antiseren erhält man dann durch Absorption mit art-, individuum- und gewebsspezifischen Antigenen. Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Durch Hybridisierung antikörperbildender Plasmazellen mit Myelomzellen und anschließende Klonierung der Zellhybride lassen sich monoklonale Antikörper gewinnen, die nur gegen eine antigene Determinante in der Tumorzelle gerichtet sind (Hellström e. a. 1980). Mit xenogenen polyklonalen Antiseren und monoklonalen Antikörpern sind bei vielen menschlichen Tumoren Antigene entdeckt worden, die anfangs oft als spezifisch für eine Tumorart oder eine Gruppe von Tumoren angesehen wurden. Mit Verfeinerung der Methodik und mit zunehmen-

der Zahl untersuchter Zelllinien und Tumorpatienten ist jedoch klar geworden, daß diese Antigene bei dem jeweiligen Tumor oft in besonders hoher Konzentration vorhanden sind, aber auch in normalen Zellen und anderen Tumoren auftreten (Roseberg 1980). Aus der Vielfalt der Untersuchungen gewinnt man den Eindruck, daß Tumorzellen sich eher durch eine große Variationsmöglichkeit der Art und Häufigkeit ihrer Antigene auszeichnen, als durch ein konstant verändertes Antigenmuster (Albino e.a. 1984). Welche Rolle die gefundenen Antigene bei der immunologischen Auseinandersetzung des Organismus mit dem Tumor spielen, kann nach ihrer xenogenen immunologischen Charakterisierung nicht beantwortet werden. Es gilt aber als gesichert, daß die Krebszelle eine Immunantwort hervorruft (Hellström u. Brown 1979).

Trotz allem gelingt es Tumoren die Abwehrmechanismen zu unterlaufen. Folgende Ursachen könnten hierfür verantwortlich sein: eine schwache Antigenität oder Antigenmodulation des Tumors, die Lokalisation des Tumors (verschiedene Körperregionen werden unterschiedlich stark vom Immunsystem kontrolliert), Blockieren der Immunreaktion durch zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe oder inkomplette Antikörper und die Überwiegende Aktivierung von Suppressorzellen (Benjamini e. a. 1982).

Auch beim Nierenkarzinom des Menschen finden sich die oben erwähnten klinischen Hinweise auf eine immunologische Auseinandersetzung des Organismus mit dem Tumor (Adolfsson 1966, De Giorgi 1972, Deweerd e. a. 1977, Everson 1964). Seit Anfang der 60er Jahre sind deshalb genauere immunologische Untersuchungen angestellt worden (Nairn 1963). Ein spezieller Vorteil des Nierenkarzinoms ist dabei, daß meist genügend gesundes Nierengewebe vorhanden ist, um das Tumorgewebe mit ihm vergleichen zu können. Zelluläre und humorale Immunreaktion gegen Nierenkarzinomantigene sind nachgewiesen worden (Ackermann 1979). Es gibt Hinweise, daß die Immunantwort durch tumorassoziierte Faktoren im Serum und an Leukozyten

adsorbiert blockiert sein kann (Kjaer 1976b). Mit xenogenen Antisera und monoklonalen Antikörpern hat man eine Vielzahl von Antigenen auf kultivierten Nierenkarzinomzellen und in Nierenkarzinomgewebe nachgewiesen (Ghose e. a. 1979, Ueda e. a. 1979, Ueda e. a. 1981, Hess e. a. 1983).

Es fehlt nicht an Bemühungen die gewonnenen Erkenntnisse klinisch nutzbar zu machen. So ist versucht worden mit radioaktiv markierten xenogenen Antisera gegen Nierenkarzinomantigene Tumormetastasen sichtbar zu machen (Belitsky e. a. 1978) oder den Nachweis von Antikörpern aus Patientensera gegen Nierentumorgewebe mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz in der Diagnostik einzusetzen (Harding e. a. 1982). Eine spezifische Immuntherapie ist mit Immun-RNA (Steel e. a. 1980, Richie e. a. 1984), abgetöteten autologen Tumorzellen (Mc Cune e. a. 1979), polymerisierten Partikeln aus autologem Tumormaterial (Tykkä e. a. 1978) und durch Herausfiltern von Serumbestandteilen (gelösten Nierenkarzinomantigenen?) mit aus Nierenkarzinomen isolierten immobilisierten Immunglobulinen (Wolff e. a. 1981) unternommen worden.

Meist sind dabei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Metastasen behandelt worden. Die Zahl der Fälle ist gering. Die Immuntherapie steht noch im Versuchsstadium (De Kernion 1983). Um sie klinisch erfolgreich einsetzen zu können, sind weitere Erkenntnisse in der Tumorummunologie notwendig.

In der vorliegenden Arbeit sollen lösliche Tumorphosphate aus Nierenkarzinomen näher charakterisiert und ihre Antigenität untersucht werden. Dabei soll geklärt werden, ob sich Proteine aus Tumor- und Normalgewebe elektrophoretisch unterscheiden und ob Nierenkarzinome im Organismus eine Immunantwort hervorrufen.

In einem weiteren Schritt wird in Kombination der beiden vorausgehenden Untersuchungen versucht, Anti-

gene, die eine Immunantwort hervorrufen, zu isolieren und elektrophoretisch zu charakterisieren.

3. U N T E R S U C H U N G S G U T U N D M E T H O D E N

3.1. Untersuchungsgut

Fünf tumortragende Nieren wurden von der Urologischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. E. Schmiedt) zur Verfügung gestellt. Sie wurden sofort nach der operativen Entnahme bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Eine nicht tumorös veränderte Niere stellte Prof. Dr. Dr. C. Hammer aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Universität München, Klinikum Großhadern zur Verfügung. Die immunologischen Testseren wurden von Patienten mit Nierentumoren und mit anderen Erkrankungen sowie gesunden Probanden entnommen.

3.2. Aufbereitung der Nieren

Alle Schritte zur Gewinnung korpuskulärer Komponenten und von Proteinen wurden bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ ausgeführt.

3.2.1. Homogenisieren und Waschen des Nierengewebes

Die eingefrorenen Nieren wurden über Nacht bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ aufgetaut, makroskopisch in Tumor- und Normalgewebe getrennt und Faszien, derbes Bindegewebe und nekrotisches Gewebe entfernt. Anschließend wurden sie in phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) (PBS) mit einem Mixer bei 2.000 Upm zerkleinert und wie folgt gewaschen:

1. Gewebsbrei 5 min bei 2.000 x g zentrifugieren;
2. Überstand verwerfen;

3. Sediment in dreifachem Volumen PBS wieder suspendieren und 5 min bei 2.000 x g zentrifugieren;

Punkt 2 und 3 wurden fünfmal wiederholt. Der klare Überstand der letzten Waschung wurde aufbewahrt. Er entspricht der Fraktion 0 (vgl. S.36).

3.2.2. Auftrennung in Zellbestandteile

Folgender Puffer wurde verwendet (STED Puffer):

0,25 M Saccharose
10 mM Tris-HCl
5 mM EDTA
2 mM Dithiothreitol
pH 7,6

Ein Volumenteil des Sediments der letzten Waschung aus 3.2.1. wurde in neun Volumenteilen STED Puffer suspendiert, 10 sec im Ultraturrax bei Stufe 8 zerkleinert und durch 10 Auf- und Abbewegungen des Stempels im Glas-Teflon-Potter homogenisiert.

Differentielles Zentrifugieren des Homogenats erfolgte wie in dem Schema auf Seite 11 dargestellt ist. Die Herstellung subzellulärer Fraktionen wurde mit Änderungen nach den Angaben von Scherberich (Scherberich e.a. 1974) durchgeführt.

- 3.2.3. Lösen von Proteinen aus den durch differentielles Zentrifugieren gewonnenen subzellulären Fraktionen S1, S2, S3, S5 und S6

a) In PBS lösliche Proteine

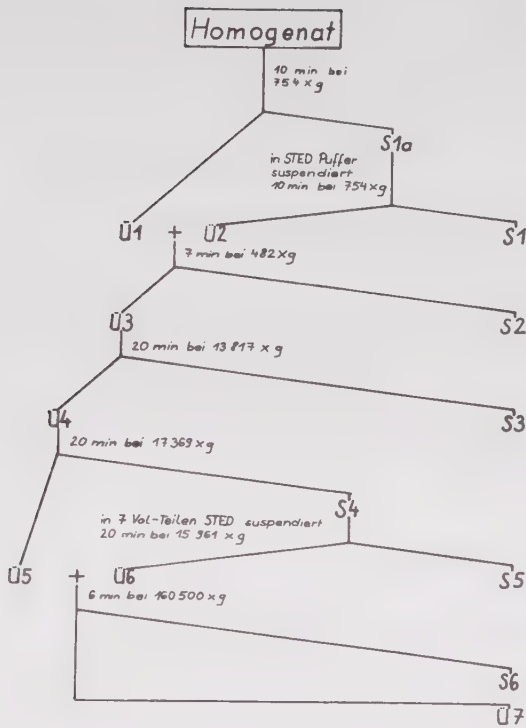


Abb. 3.1. Schema der differentiellen Zentrifugation

Ü : Überstand

S : Sediment

Die Sedimente S1 - S6 wurden in möglichst kleinen Mengen PBS suspendiert und standen etwa 12 Stunden im Kühlraum bei 4°C. Anschließend wurden sie 10mal 30 sec beschallt mit je 5 min Pause dazwischen. Die Beschallung wurde mit einem Branson^R Sonifier S 75 bei maximaler Stärke durchgeführt. Die Suspension wurde 30 min bei 160.500 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt in PBS durch Ultraschall gelöste Proteine.

b) Triton-X-100 lösliche Proteine

Die Sedimente, die nach dem Herauslösen von Proteinen durch Ultraschallbehandlung übrigblieben, wurden in PBS mit 1% Triton-X-100 (v/v) suspendiert, 60 min geschüttelt und 30 min bei 160.500 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt Triton-X-100 lösliche Proteine. Die Proteinlösungen wurden zu 200 µl portioniert bei -80°C aufbewahrt.

3.3. Aufbereitung der Seren

3.3.1. Gewinnung der Seren aus Vollblut

Serum wurde von korpuskulären Blutbestandteilen durch 20 min Zentrifugieren bei 4.000 x g bei Zimmertemperatur getrennt, abpipettiert und zu 1,5 ml in Plastikreagiergefäßen portioniert bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2. Herstellen der Immunglobulinfraktion (Ammoniumsulfatfällung)

Das gewonnene Serum wurde durch 60 min Inkubation bei 56°C inaktiviert und dann wieder auf 4°C abgekühlt. In 10 ml Serum wurde darauf vorsichtig tropfenweise unter stetigem Rühren 8,7 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 8,0 mit NaOH eingestellt) zugegeben, das Präzipitat durch 5 min Zentrifugieren bei 4.000 x g

sedimentiert, der Überstand verworfen, das Sediment in 45% Ammoniumsulfatlösung suspendiert und wieder 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wiederholte sich 5mal.

Anschließend wurde das Präzipitat in der kleinstmöglichen Menge PBS aufgelöst und 2mal gegen 1.000 ml PBS bei 4°C dialysiert.

3.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Methode von Bio-Rad^R, wie hier kurz beschrieben, angewandt: Bio-Rad^R Färbelösung mit H₂O 1:5 verdünnen; mit einer Verdünnungsreihe der Proteinstandardlösung von Bio-Rad^R (Rinder- γ -Globulin) eine Eichkurve herstellen; 0,1 ml Proteinlösung zu 5 ml verdünnter Färbelösung geben, gut schütteln; Extinktion bei 595 nm messen, Doppelbestimmung durchführen; Proteinkonzentration rechnerisch aus Steigung der Eichkurve ermitteln.

3.5. Elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben:

3.5.1. Polyacrylamidgel - Elektrophorese mit SDS (SDS PAGE)

Die Durchführung erfolgte zum Teil nach den Angaben von Maurer (Allen, Maurer 1974; Maurer 1971) und Gordon (Gordon 1975).

3.5.1.1. Probenvorbereitung:

Probenpuffer: 2% SDS; 1% Mercaptoäthanol; 10 mM
Tris-HCl pH 8,5

Die lyophilisierten bzw. mit TCA ausgefällten Proben wurden im Probenpuffer aufgelöst (2,5 mg Protein/1 ml Puffer).

Vorher wurden die Proben 3mal 12 Stunden unter Rühren gegen die 200fache Menge H₂O in Dialyseschläuchen

mit einem nominellen Ausschlußvolumen von Substanzen mit mehr als 10.000 Dalton Molekulargewicht oder in mit Dialysemembran verschlossenen Plastikreagiergefäßen dialysiert. Volumina mit 1 mg Protein wurden nach der Dialyse in Reagiergefäße pipettiert, die Öffnung mit dünnem Filterpapier überspannt und lyophilisiert.

Bei einem Teil der Triton-X-100 enthaltenden Proben wurde Protein nach folgendem Rezept in Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt:

0,5 ml Proteinlösung mit 1 ml 15% TCA vermischen,
2 min stehen lassen und 2 min in Tischzentrifuge
sedimentieren;

Sediment in 1 ml 5% TCA suspendieren und 2 min
zentrifugieren;

diesen Schritt wiederholen;

Sediment in 1 ml Äther-Äthanol-Gemisch (Volumen-
verhältnis 1:3, Äthanol wasserfrei) suspendieren
und 2 min zentrifugieren;

Waschen mit Äther-Äthanol-Gemisch wiederholen;

Sediment in Äther suspendieren und 2 min zentri-
fugieren, Überstand vorsichtig abkippen, letzten
Rest mit Filterpapier aufsaugen, Sediment an der
Luft trocknen lassen.

3.5.1.2. Herstellen von Polyacrylamidgelen

Stammlösungen:

1. Acrylamidlösung A30: 30 g Acrylamid und 0,8 g
Bismethylacrylamid in
100 ml H_2O lösen;
2. Pufferstammlösung: 1 M Tris-HCl pH 8,3;
1% SDS
3. TEMED (Tetramethyläthylendiamin)
4. 2% Ammoniumpersulfat (APS)
(immer frisch ansetzen!)

a) 7,5% Rundgele:

Glasröhrcheninnendurchmesser: 5 mm

Länge: 125 mm

Die Glasröhrchen wurden vor Gebrauch wie folgt silikonisiert, um die Gele nach der Elektrophorese leichter entfernen zu können:

1. reinigen in Aceton;
2. trocknen;
3. 1 Stunde in Silikonlösung von Serva^R legen;
4. 12 Stunden bei 95°C aufbewahren.

15 ml A30, 6 ml Pufferstammlösung, 48,47 ml H₂O, 180 µl TEMED wurden in einen Glaskolben gegeben, etwa 4 min mit einer Wasserstrahlpumpe bei Raumtemperatur entgast, 350 µl 2% APS zugegeben und kurz im Wasserstrahlvakuum geschüttelt. Die Lösung wurde in die unten mit Gummihülsen verschlossenen Glasröhrchen bis 1 cm unterhalb des Randes gefüllt und mit 20% Äthanol überschichtet. Nach spätestens 30 min war das Gel polymerisiert. Die Flüssigkeit über dem Gel wurde entfernt, 1 cm 4% Gel auf das 7,5% Gel pipettiert und wieder mit 20% Alkohol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt, die Röhrchen mit Laufpuffer aufgefüllt und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Bei 10- und höherprozentigen Gelen wurden die Gele während der Polymerisation auf 8 - 10°C abgekühlt, um das Auftreten von Gasblasen zu verhindern.

b) Gradientenrundgele:

Die Röhrchen hatten den gleichen Durchmesser und die gleiche Länge wie oben. Die Mengenangaben gelten für 18 Röhrchen. Die Gele hatten am oberen Ende eine Acrylamidkonzentration von 4% am unteren von 24%.

Beschreibung des Gerätes zum Gießen der Gele
(Abb. 3.2.):

Es besteht aus 2 zylinderförmigen Gefäßen zur Aufnahme des 4% und 24% Gels, die unten seitlich mit je einer Öffnung versehen sind. Als Verbindungsstück zwischen ihnen und einer Weiche (LKB^R 11320) dient je 1 Silikonschlauch mit 1,5 mm Durchmesser. Auch alle anderen Teile sind durch Silikonschläuche mit gleichem Durchmesser verbunden. Die Weiche wird von einem Steuergerät (LKB^R 11300), zu dessen Programmierung 3 verschiedene Kurven (Abb. 3.3. a - c) verwendet werden, bedient. Hinter der Weiche befindet sich eine 3 cm³ große Mischkammer mit Magnetrührer (LKB^R 11360, LKB^R 11361), auf die eine Pumpe folgt. Sie befördert die Gellösung in den Verteiler, über den sie von unten in die Röhrchen gelangt. Von den Gefäßen bis zur Pumpe werden alle gellösungenthaltenden Teile mit Eiswasser auf 0°C gekühlt. Der Verteiler und die Röhrchen stehen in einem Wasserbad mit steuerbarer Temperatur bei zunächst 0°C.

Gießen der Gele:

60 ml 24% Gel (48 ml A30; 6 ml Pufferstammlösung; 180 µl TEMED; 5,46 ml H₂O) und 30 ml 4% Gel (4 ml A30; 3 ml Pufferstammlösung; 60 µl TEMED; 22,69 ml H₂O) wurden hergestellt, 4 min bei Raumtemperatur entgast und 10 min in Eiswasser gekühlt. Vor dem Auffüllen wurden Gelreservat, Verteiler und Röhrchen mit Stickstoff ausgeblasen. Dann wurden zum 24% Gel 350 µl, zum 4% Gel 250 µl 2% APS zugegeben, beide Lösungen in die beiden zylinderförmigen 80 ml großen Gefäße geschüttet, mit Stickstoff überschichtet und der Rührmotor darunter angestellt. Nachdem die 24% und 4% Lösungen die Weiche erreicht hatten, wurde sie so gestellt, daß zuerst die 4% Lösung angesaugt wurde, und Steuergerät sowie Pumpe gestartet. Die Geschwindigkeit des Lichtstrahls im Steuergerät auf der x-Achse betrug 20 cm/15 min, die Pumpgeschwindigkeit 60 ml/15 min. Der Magnetrührer in

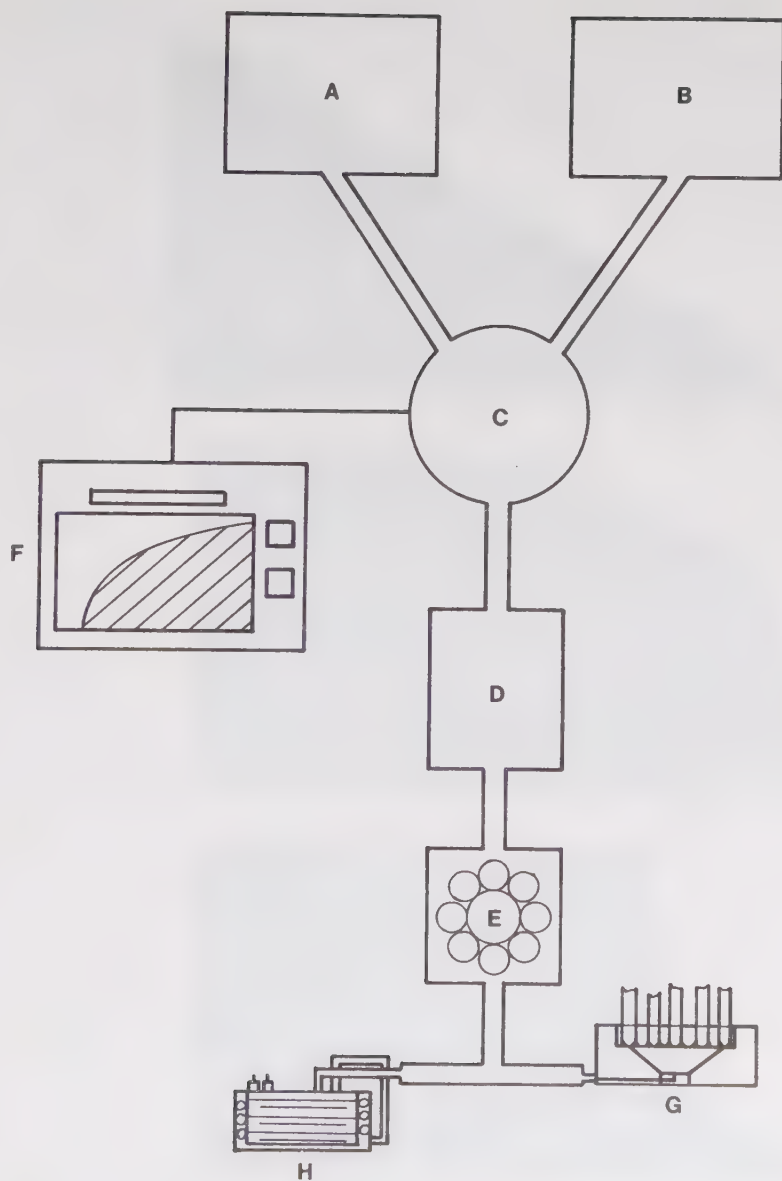


Abb. 3.2. Legende s. S. 19



Abb. 3.3.a. Legende s. S. 19

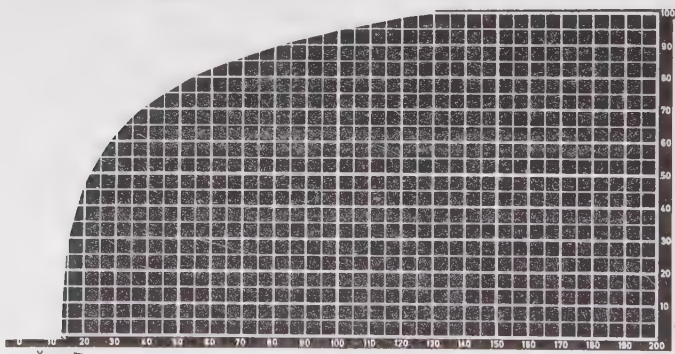


Abb. 3.3.b. Legende s. S. 19

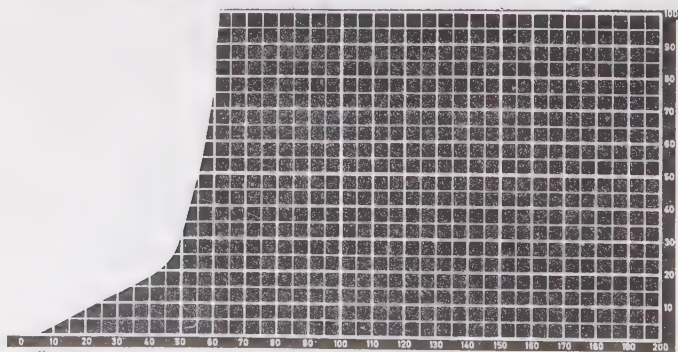


Abb. 3.3.c. Legende s. S. 19

Legende zu Abb. 3.2. S. 17

Schematische Darstellung des Gerätes zum Gießen von Gradientengelen

- A : zylinderförmiges Gefäß zur Aufnahme des 4% Gels
- B : zylinderförmiges Gefäß zur Aufnahme des 24% Gels
- C : Weiche
- D : Mischkammer mit Magnetprüher
- E : Pumpe
- F : Steuergerät für Weiche
- G : Verteiler zum Gießen von Rundgelen
- H : schematische Darstellung des Gießens von Flachgelen

alle gellösungenthaltenden Teile sind auf 0°C gekühlt;
der Verteiler zum Gießen von Rundgelen steht in einem Wasserbad
mit steuerbarer Temperatur;
die Flachgelelektrophoresekammer (H) ist an einen Kryostat ange-
schlossen;

Legende zu Abb. 3.3.a. - c. S. 18

Kurven zur Programmierung des Steuergerätes (F in Abb. 3.2.)

- a. : für lineare Gradienten
- b. : für exponentielle Gradienten
- c. : für exponentielle Gradienten

der Mischkammer wurde eingeschaltet, sobald sie mit Gel gefüllt war. Nach Füllende (Geloberfläche 5 mm unterhalb des Röhrchenrandes) wurden die Röhrchen mit 2 x 10 ul 20% Äthanol überschichtet. Bei Erreichen etwa der halben Füllhöhe der Röhrchen wurde das Wasserbad aufgeheizt, so daß es 15 min nach Füllende 20°C erreichte, dann 5 min bei 20°C belassen und innerhalb 3 min auf 14°C abgekühlt. Etwa 15 min danach wurden die fertig polymerisierten Gele mit dem Verteiler aus dem Wasserbad genommen, die Röhrchen aus dem Verteiler gezogen, Flüssigkeit über den Gelen abpipettiert und die Röhrchen mit Laufpuffer aufgefüllt bei 4°C aufbewahrt.

c) Vertikale Flachgele:

Die Flachgele wurden in der Elektrophoresekammer gegossen. Ihre Größe betrug 0,2 cm x 23 cm x 15 cm. Das Elektrophoresegerät entsprach mit Modifikationen in seiner Konstruktion den Angaben von Gordon (Gordon 1975).

Gießen der Gele:

In die Gelkammer des schräg auf die Vorderkante gestellten Elektrophoresegerätes wurden 60 ml 10% Gel eingefüllt und dadurch das untere Ende der Kammer abgedichtet. Die überstehende Flüssigkeit nach der Polymerisation des Gelkeils wurde mit Filterpapier abgesaugt.

Normale Gele:

40 ml 7,5% Gel wurden auf den Gelkeil in die Kammer gegossen, mit 20% Äthanol überschichtet, nach der Polymerisation die restliche Kammer mit 5% Gel aufgefüllt und der Kamm zur Ausformung der Probenauftragstellen in die Gelkammer geschoben. Dabei war darauf zu achten, daß keine Luftblasen sich in den Aussparungen festsetzten.

Gradientengele:

Wie nachfolgend kurz skizziert wurden Gele mit 7,5% bis 24% linearen Acryamidkonzentrationsgradienten hergestellt.

Die Gelkammer wurde unten mit einem Gelkeil (10%) abgedichtet und Gradientengele mit dem gleichen Gerät wie bei Rundgelen beschrieben hergestellt. Die Weiche wurde so gestellt, daß zuerst 24% Gel angesaugt wurde. Die Gelkammer wurde mit Stickstoff ausgeblasen. In der Mitte oben wurde der von der Pumpe kommende Schlauch in die Gelkammer eingeklemmt und von dort die Kammer bis etwa 3 cm unter dem oberen Rand aufgefüllt. Pumpgeschwindigkeit und Geschwindigkeit des Lichtstrahls auf der x-Achse des Steuergeräts waren entsprechend darauf abgestimmt. Die Temperatur des Gels wurde über die Kühlschlangen des Elektrophoresegerätes, die an einen Kryostaten angeschlossen waren, während der Polymerisation wie bei den Rundgelen gesteuert. Nach der Polymerisation des Gradientengeles wurde noch ein 5% Gel, das die Auftragstellen enthielt, aufpolymerisiert.

3.5.1.3. Elektrophorese:

a) Rundgele:

Elektrophoresepuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 8,3

0,1 % SDS

Gerät: Elektrophoresekammer 150 A von Bio-Rad^R

Die Rundgele wurden so in die Röhrchenhalter gesteckt, daß der Gel enthaltende Teil der Röhrchen später ganz vom Puffer der unteren Kammer umgeben war und untere und obere Kammer mit Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde das Elektrophoresegerät auf einen Rüchmotor gestellt, um den unteren Puffer mit einem Magnetrührer umzuwälzen, und an einen Kryostaten und die Stromversorgung angeschlossen. Die Elektrophorese wurde wie folgt durchgeführt

(die Temperatur des Puffers in der unteren Kammer betrug 4°C):

1. Vorlauf ohne Probe 50 min mit 8 mA pro Röhrchen;
2. Puffer bis in Höhe der oberen Röhrchenränder entfernen;
3. Probenauftrag: 20 - 50 μl der Probe unter den Elektrophoresepuffer auf die Oberfläche des Gels schichten und Kammer wieder auffüllen;
4. Einwandern der Proteine 20 min bei 1,5 mA pro Röhrchen;
5. Lauf bei 8 mA pro Röhrchen 3 Stunden, Feldstärke etwa 20 ($\text{V} \times \text{cm}^{-1}$).

b) Flachgele:

Die Temperatur der Kühlblöcke wurde über einen Kryostat auf 4°C eingestellt, der Puffer zwischen oberer und unterer Pufferkammer mit einer Pumpe umgewälzt. Die Elektrophorese lief wie folgt ab:

1. Vorlauf 50 min 130 mA;
2. oberen Puffer bis in Höhe des oberen Randes der Probenauftragstellen entfernen und Proben (20 - 40 μl) auftragen, obere Kammer wieder füllen;
3. Einwandern der Proteine 20 min bei 40 mA;
4. Lauf 3 Stunden mit 300 mA.

3.5.1.4. Färben der Gele

a) Rundgele:

Nach dem Lauf wurden die Röhrchen aus dem Elektrophoresegerät herausgenommen. Mit einer 10 ml Plastikspritze und einer 10 cm langen Injektionsnadel mit 0,5 mm Durchmes-

ser (Acufirm^R) wurde vorsichtig Elektrophoresepuffer zwischen Gel und Röhrchen gespritzt, so daß sich das Gel von der Glaswand löste. Dann wurde ein Gummiball am oberen Ende des Röhrchens angesetzt und das Gel herausgedrückt. Das Gel glitt in das Färbebad.

Zusammensetzung des Färbebades:

0,125% Coomassie-Brilliant-Blau R 250 in Methanol:
Eisessig:H₂O (5:1:5, v:v:v)

Der Entfärber bestand aus dem gleichen Lösungsmittel. 4 Stunden wurden die Gele angefärbt und etwa 24 Stunden entfärbt, bis der Untergrund klar war. Die Gele wurden in Reagenzgläsern in H₂O bei 4°C aufbewahrt.

b) Flachgele:

Nach der Elektrophorese wurde die Gelkammer aufgeklappt, das Gel entnommen und wie unter a) beschrieben angefärbt oder für die 2. Dimension zurechtgeschnitten.

3.5.2. Isoelektrofokussieren in Polyacrylamidrundgelen (IPFAG)

Die Methode wurde zum Teil nach den Angaben von Winter durchgeführt (Winter e. a. 1977).

3.5.2.1. Probenvorbereitung

Die Proben wurden gegen H₂O dialysiert, lyophilisiert und in 2% Ampholytlösung aufgelöst. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml.

3.5.2.2. Herstellen der Gele

Röhrchenlänge: 90 mm

Innendurchmesser: 2,7 mm

Für 8 ml Gel wurden folgende Mengen der einzelnen Reagenzien benötigt:

1,94 ml A30

1,03 ml 87% Glyzerin

0,45 ml Ampholine^R pH 3,5 - 9,5, wenn die Probe nicht mit Ampholyt versetzt war

0,40 ml Ampholine^R pH 3,5 - 9,5, wenn Proteine sich schon in 2% Ampholytlösung befanden

4,31 ml bzw. 4,81 ml H₂O

0,4 ml Gel wurden in 5 ml große Plastikreagiergefäße pipettiert, 0,05 ml Proteinprobe hinzugefügt, geschüttelt, 1 - 2 min entgast und 15 µl 1% APS dazugegeben. Auf die Röhrchen wurden gelbe Plastikpipettenspitzen gesetzt, mit einem Gummiball das Gel aus dem Plastikreagiergefäß in die Röhrchen gesaugt, die Pipettenspitze entfernt und die Röhrchen unten mit Dialysemembran verschlossen. Sie wurden in einen Röhrchenständer gestellt - die Dialysemembran tauchte dabei in H₂O - und das Gel mit 20% Alkohol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Überstand abpipettiert und restliches Gel, ohne es mit Probenlösung zu versetzen, aufpolymerisiert.

3.5.2.3. Elektrophorese:

Anodenlösung: 0,5% Phosphorsäure

Kathodenlösung: 2% Äthylendiamin

Die Röhrchen wurden in das Elektrophoresegerät (Abb. 3.4.) geschoben, die obere Kammer mit Kathodenlösung, die untere mit Anodenlösung aufgefüllt, die mittlere an einen Kryostat angeschlossen (Kühlflüssigkeittemperatur 0°C).

Laufbedingungen: 20 min 300 V

1 Stunde 40 min 800 V

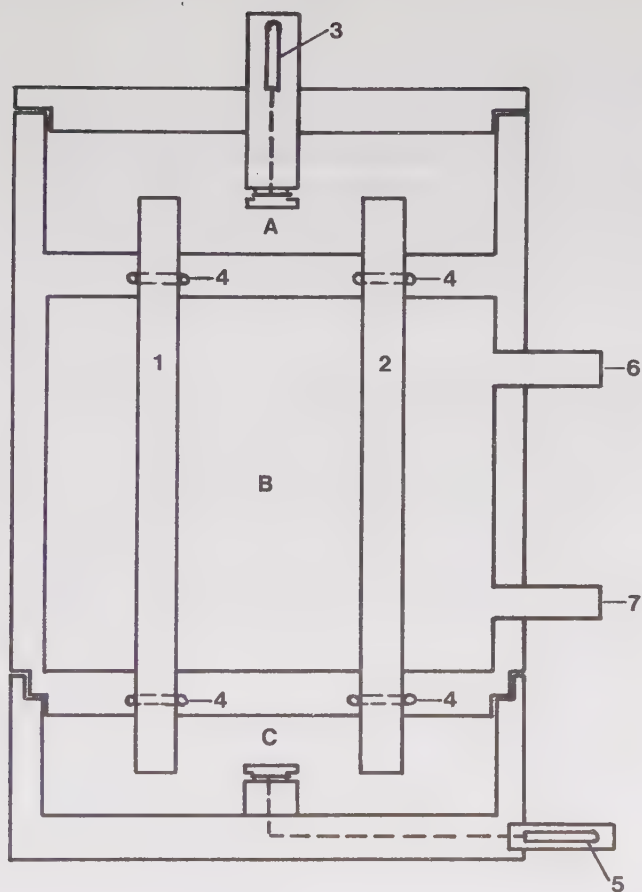


Abb. 3.4. Elektrophoresegerät für IFPAG mit Rundgelen

A : Kammer für Kathodenflüssigkeit

B : Kammer mit Kühlmittel

C : Kammer für Anodenflüssigkeit

1, 2 : 2 von 12 Glasröhrchen

4 : Dichtungsringe

6 : Ausflußstutzen für
Kühlflüssigkeit

3 : Kathode

5 : Anode

7 : Einlaufstutzen für
Kühlflüssigkeit

3.5.2.4. Fixieren und Färben:

Sofort nach dem Lauf wurden die Gele wie bei der SDS Elektrophorese aus den Röhrchen entfernt (vgl. 3.5.1.4.), 30 min in 20% TCA-Lösung fixiert, dann im Entfärber gewaschen, 30 min gefärbt und 4 Stunden entfärbt. Es wurde die gleiche Färbe- und Entfärbelösung wie unter 3.5.1.4. verwendet.

3.5.3. Densitometrische Auswertung von Rundgelen

Gerät: Gilford^R Spektrophotometer 2400S
Gilford^R Linear Transport

Die Gele wurden in eine Quarzglasküvette mit H₂O gelegt, alle Luftblasen entfernt und unter folgenden Bedingungen abgetastet:

Extinktion 595 nm
Vorlaufgeschwindigkeit der Küvette 1 cm x min⁻¹
Calibration am Schreiber 1,0
Papiervorlaufgeschwindigkeit 1 inch x min⁻¹.

3.6. Immunologische Untersuchungsmethoden

3.6.1. Herstellen der Agarosegele

Barbitalpuffer: 13,38 g 5,5 Diäthylbarbiturat-
säure-Natriumsalz
8,83 g Natriumacetat x 3 H₂O
in 1,5 l H₂O lösen
mit 0,1 n HCl pH 8,2 einstellen
und auf ein Endvolumen von 1,7 l
mit H₂O auffüllen.

1,5 g Agarose H (LKB^R) wurden in 50 ml H₂O und 50 ml Barbitalpuffer suspendiert, einige Körnchen Natrium-

acid und eventuell 0,5 ml Triton-X-100 zugegeben. Die Agaroselösung wurde unter Rühren auf 90°C erhitzt und mit einer Pipette auf Glasplatten oder Folien (LKB^R Plastic Plates 2117-406) gegossen (25 ml/100 cm²). Nach etwa 1,5 Stunden wurden sie in eine feuchte Kammer gegeben und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

3.6.2. Immundoppeldiffusion

In das Gel wurden Löcher gestanzt (Abb. 3.5.) und mit der Wasserstrahlpumpe das Gel aus ihnen entfernt. Mit Mikropipetten wurden die Proben aufgetragen (70 µl Antiserum 10 µl Proteinlösung) und das Gel 2 - 3 Tage in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Protein 2 - 8 Tage in einem PBS-Bad herausgelöst, das, wenn mit Triton-X-100 gearbeitet wurde, 0,5% Triton-X-100 enthielt, und das Gel zwischen 2 Lagen dickem Filterpapier und 2 Glasplatten gepreßt (1 kg/100 cm²).

Zum Färben wurde das Gel 10 min in Coomassie-Brilliant-Blau R 250 Lösung und 1 - 2 Tage in Entfärber gegeben (Zusammensetzung wie unter 3.5.1.4.). Die gefärbten Gele wurden an der Luft getrocknet.

3.6.3. Gegenstromelektrophorese

Der pH-Wert der Gele betrug 8,1 - 8,6, der Agaroseanteil 1,1% - 1,5%. Mit einer Schablone wurden Löcher von 2, 4 oder 6 mm Durchmesser ausgestanzt (Abb. 3.6.). Die Gelplatten wurden auf den Kühlblock eines Elektrophoresegerätes für horizontale Elektrophoresen gelegt, die Pufferkammern mit je 750 ml Barbitalpuffer (gleicher pH wie das Gel) und 750 ml H₂O aufgefüllt und Kontakt zwischen Puffer und Gel durch 4 Lagen eines Zellulosetuches (Bonline^R) hergestellt. Das Zellulosetuch lag etwa in einer Breite von 5 mm dem Gel auf. Die Proteinproben wurden in die Löcher pipettiert, der Deckel geschlossen und der

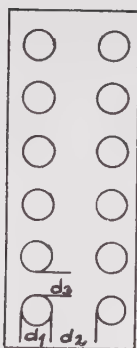


Abb. 3.6.a.
Legende s. S. 29

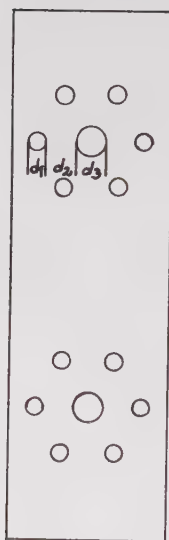


Abb. 3.5. Legende s. S. 29

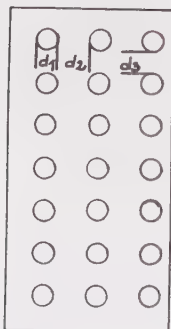


Abb. 3.6.b.
Legende s. S. 29

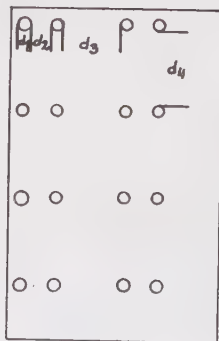


Abb. 3.6.c.



Abb. 3.7.
Legende s. S. 29

Legende zu Abb. 3.5. S. 28

Ausschnitt aus einer Schablone zum Stanzen von Löchern in Agarosegele für die Immundoppeldiffusion

d_1 : 3 mm Löcher für 10 ul Proteinprobe

d_2 : 5 mm

d_3 : 6 mm Löcher für 70 ul Antiserum

Legende zu Abb. 3.6.a. - c. S. 28

Ausschnitte aus Schablonen zum Stanzen von Löchern in Agarosegele für die Gegenstromelektrophorese

Abb. 3.6.a.

d_1 : 6 mm Löcher für 50 - 70 ul Antiserum bzw. Proteinprobe

d_2 : 8 mm

d_3 : 3,5 mm

Abb. 3.6.b.

d_1 : 4 mm Löcher für 20 - 30 ul Antiserum bzw. Proteinprobe

d_2 : 6 mm

d_3 : 3 mm

Abb. 3.6.c.

d_1 : 2,5 mm Löcher für 7 - 10 ul Antiserum bzw. Proteinprobe

d_2 : 4 mm Abstand der Löcher für Proteinprobe u. Antiserum

d_3 : 10 mm

d_4 : 14 mm

Legende zu Abb. 3.7. S.28

Plexiglasschablone zum Auftragen von Proteinproben und Antiseren in der Mikrogegenstromelektrophorese

d_1 : 3 mm (zum Auftragen von etwa 20 ul Proteinprobe bzw. Antiserum)

d_2 : 4 mm

d_3 : 3,5 mm

die Plexiglasschablone ist etwa 3 mm dick

Kühlblock mit Leitungswasser gekühlt. Der Puffer wurde zwischen den beiden Kammern während des Laufes umgewälzt. Die Elektrophorese dauerte 2 Stunden bei $4,5 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$. Anschließend wurde aus den Gelen 2 - 8 Tage in einem PBS-Bad (evtl. mit 0,5% Triton-X-100) überschüssiges Protein herausgewaschen. Pressen und Anfärben erfolgte wie bei der Immundoppeldiffusion.

3.6.4. Mikro-Immundoppeldiffusion und Mikro-Gegenstrom-elektrophorese

Die Gele wurden wie folgt hergestellt. Entfettete Objektträger ($2,5 \text{ cm} \times 7,5 \text{ cm}$) wurden in 0,2% heiße Agaroselösung getaucht und getrocknet. Auf die so vorbehandelten Objektträger wurden $0,2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ große, $0,24 \text{ mm}$ dicke Parafilmstreifen (entspricht 2 Lagen Parafilm) gelegt, etwa 1 ml heiße Agaroselösung (vgl. 3.6.1.) auf den Objektträger pipettiert, ein unbehandelter Objektträger daraufgepreßt und der Überschuß nach Abkühlen entfernt. Die Gele wurden dann 1 Tag bei 4°C aufbewahrt.

Vor der Immundoppeldiffusion bzw. Gegenstromelektrophorese wurde der obere Objektträger vom Gel entfernt und eine Plexiglasschablone (Abb. 3.7.) vorsichtig auf das Gel geschoben (es dürfen keine Lufteinschlüsse zwischen Gel und Schablone entstehen). Dann wurden die Proben in die Löcher der Schablone pipettiert. Immundoppeldiffusion und Elektrophorese wurden wie unter 3.6.2. und 3.6.3. durchgeführt. Die Zeiten für Herauswaschen des überschüssigen Proteins, Färben und Entfärben betrugen 1 - 2 Tage, 5 min und 1 Stunde.

3.6.5. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von Präzipitaten

Die Gegenstromelektrophorese wurde wie unter 3.6.5. durchgeführt (Lochdurchmesser 2 mm) und überschüssiges Protein 6 Tage unter Schütteln in einem PBS-Bad mit 0,5%

Triton-X-100 herausgewaschen. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden fluoresceinkonjugierte Anti-Human-Immunglobulin G Antikörper vom Schaf (Wellcome^R) benutzt. Von ihnen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und 100 μ l verdünnte Antikörperlösung nach dem Pressen des Agarosegeles auf den Bereich zwischen 2 Auftragslöchern pipettiert. Nach 1 Stunde in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur wurde das Gel nochmals 3 Tage in PBS mit 0,5% Triton-X-100 unter Lichtausschluß gewaschen und anschließend unter einer UV-Lampe betrachtet.

Die immunologischen Untersuchungen wurden im wesentlichen nach den Angaben von Crowle (Crowle A.J. 1973) durchgeführt.

3.7. Kombination von SDS PAGE und Immunelektrophorese

Die Methode wurde von Converse und Papermaster übernommen (Converse u. Papermaster 1975).

3.7.1. SDS PAGE

Die Proteinproben wurden zuerst wie unter 3.5.1.3.b in Flachgelen aufgetrennt, die Gele in Streifen geschnitten und die Vergleichsstreifen angefärbt.

3.7.2. Herstellen des Agarosegeles

Benötigte Reagenzien: Puffer: 0,4 M Tris; 0,2 M Na-Acetat; 5 mM Na₂-EDTA; mit konzentrierter Essigsäure pH 7,4 einstellen; zum Gebrauch 5fach verdünnen.

Agarose H (LKB^R)

Lubrol PX (Sigma^R)

Gießen des Geles:

Die Küvette wurde, wie in Abb. 3.8. gezeigt, zusammengesetzt, mit Silikonfett abgedichtet und auf 80°C vorgewärmt. Anschließend wurde das Gel wie folgt gegossen:

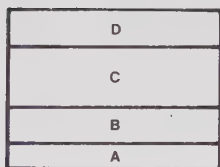
1. Lubrol enthaltende Gelschicht: 1,1 g Agarose in 100 ml verdünntem Puffer bei 80°C auflösen; 10% (v/v) Lubrollösung in Puffer auf 70°C erwärmen; 10 Volumenteile Agaroselösung und 3 Volumenteile Lubrollösung vermischen; 4,5 ml (= 2,5 cm Höhe) Gel in Küvette pipettieren und 5 min gelieren lassen.
2. Antiserum enthaltende Gelschicht: 6,1 ml Agaroselösung auf 55°C abkühlen lassen; etwa 5% (v/v) Antiserum in das Gel mischen und in die Küvette pipettieren (= 4 cm Höhe, Pipette anwärmen); 5 min gelieren lassen.
3. Küvette bis zum Rand mit Agaroselösung auffüllen.

3.7.3. Immunelektrophorese

Die Gelküvette wurde geöffnet, am unteren Rand ein 2 cm breiter Agarosegelstreifen entfernt und durch einen Polyacrylamidgelstreifen ersetzt, der die in der SDS PAGE aufgetrennte Proteinprobe enthielt. Der Kontakt zwischen beiden Gelen wurde mit heißer Agaroselösung hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte dann in dem bei der Gegenstromelektrophorese benutzten Gerät 4 Stunden bei 100 V unter Leitungswasserkühlung.

Nach dem Lauf wurde das Polyacrylamidgel entfernt und das Agarosegel wie unter 3.6.2. angefärbt.

a.



b.

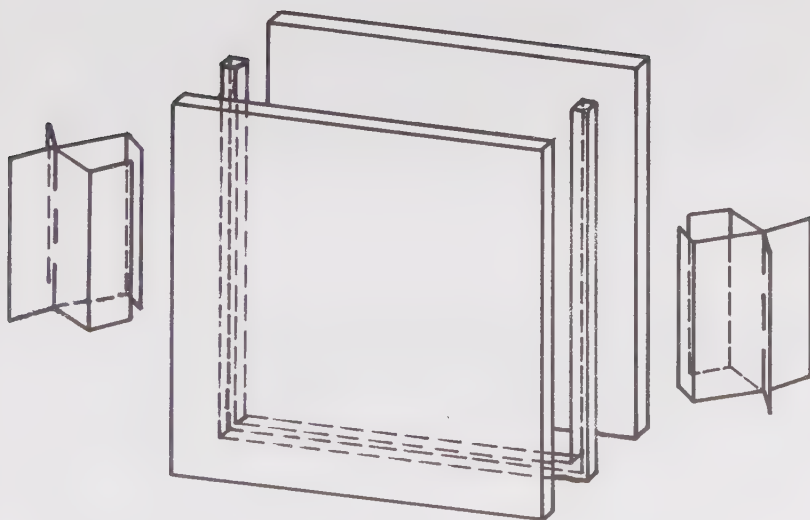
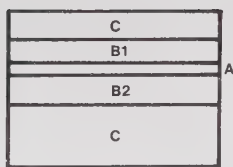


Abb. 3.8. Kuvette zum Gießen von Agarosegelen für die Immunelektrophorese

a. : Schichtung des Gels für SDS PAGE - Immunelektrophorese

A : Platz für SDS PAGE Gelstreifen B : lubrolenthaltendes Gel

C : antiserumenthaltendes Gel D : Gel ohne Zusatz

b. : Schichtung des Gels für IFPAG - Immunelektrophorese

A : Streifen, der vor der Immunelektrophorese aus dem antiserumhaltigen Gel zur Aufnahme des IEF Geles herausgeschnitten wird

B1, B2 : antiserumhaltiges Gel

C : Gel ohne Zusatz

3.8. Kombination von IFPAG und Immunelektrophorese

3.8.1. IFPAG wurde wie unter 3.5.2. durchgeführt.

3.8.2. Herstellung des Agarosegeles

Abb. 3.8. zeigt die verwendete Kuvette. Die Gel-lösung hatte die gleiche Zusammensetzung wie unter 3.6.1.. Die Herstellung des Gels sei hier kurz angegeben:

1,1 g Agarose in 50 ml Barbitalpuffer und 50 ml H₂O suspendieren und auf 90°C erhitzen; 4 ml Agaroselösung in Kuvette pipettieren und gelieren lassen; 4 ml Agaroselösung auf 55°C abkühlen lassen und 1,2% (v/v) Antiserum zugeben; in Kuvette pipettieren, 2 min warten und Kuvette bis zum Rand mit Agaroselösung auffüllen.

3.8.3. Immunelektrophorese

Kurz vor der Elektrophorese wurde die Kuvette auseinandergenommen, in der Mitte aus dem Antiserum enthaltenden Gel ein 3 mm breiter Streifen ausgeschnitten und das IEF-Gel hineingelegt. Anschließend wurde die Platte auf einen Heizblock (50°C) gelegt und das IEF-Gel gleichmäßig mit heißer Agaroselösung überzogen. Elektrophorese und Färbung wurden wie unter 3.7.3. durchgeführt.

3.9. Kombination von Gegenstromelektrophorese und SDS PAGE

3.9.1. Gegenstromelektrophorese

Die Gegenstromelektrophorese wurde wie unter 3.6.3. ausgeführt (pH 8,1; 16 ml 1,5% Agarosegel auf Folie; Lochdurchmesser 6 mm; horizontaler Lochabstand 4 mm).

3.9.2. Vorbereitung der Agarosegele für die SDS PAGE

4 - 5 Lochpaare wurden jeweils mit der gleichen Proteinprobe und dem gleichen Serum aufgefüllt. Nach dem Lauf wurde 7 - 10 Tage überschüssiges Protein in PBS mit 0,5% Triton-X-100 unter Schütteln ausgewaschen, eines der Paare ausgeschnitten und wie unter 3.6.2. angefärbt. Das restliche Gel wurde 1 Stunde gepreßt, der gefärbte Ausschnitt wieder in die Gelplatte eingesetzt, auf Millimeterpapier die Lage der Präzipitationslinie zu den Löchern ausgemessen und im ungefärbten Gel im entsprechenden Bereich ein kleiner Gelstreifen ausgeschnitten (etwa 0,5 mm rechts und links der Präzipitationslinie). Ebenso wurde der Bereich rechts und links von diesem Streifen bis zum jeweiligen Loch entfernt (Abb. 4.34.). Die Gelstückchen der jeweils gleichen Bereiche zwischen 4 Lochpaaren wurden in 1,5 ml Plastikreagiergefäße eingebracht und mit 40 μ l Probenpuffer (3.5.1.1.) versetzt.

3.9.3. SDS PAGE

Sie wurde wie unter 3.5.1.3.a in Rundgelen mit einem Gradienten wie in Abb. 3.2.b bis einschließlich Vorlauf durchgeführt. Dann wurde der Laufpuffer bis zum oberen Röhrchenrand entfernt. Das Agarosegel mit dem Probenpuffer in den Plastikreagiergefäßen wurde 30 sec auf 90°C erhitzt, in heiße Mikroliterpipetten aufgenommen und unter den im Röhrchen befindlichen Laufpuffer auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die obere Kammer wieder aufgefüllt und Elektrophorese und Färbung wie unter 3.5.1.3.a und 3.5.1.4.a ausgeführt.

4. ER G E B N I S S E

4.1. Bezeichnung der Seren und Proteinproben

Im folgenden Teil werden für Seren und Proteinproben Kürzel verwendet, die eine nähere Kennzeichnung des Untersuchungsgutes gestatten.

Der Code für die Seren und Immunglobulinfraktionen besteht aus 3 Teilen:

1. Jedem Probanden wurde eine Nummer zugeordnet. Nierenkarzinompatienten wurden von 1 - 15 fortlaufend nummeriert. Andere Seren erhielten eine 0 als erste Ziffer.
2. S bedeutet Serum,
Ig bedeutet Immunglobulinfraktion (vgl. (3.3.2.)).
3. Wurde von einem Patienten mehrmals Blut entnommen, so gibt der dritte Teil des Codes an, um die wievielte Blutprobe es sich handelt:
1 = Blutentnahme vor Nephrektomie;
2 = Blutentnahme 1 Woche postoperativ;
3 = Blutentnahme 3 Wochen postoperativ.

Die Kennzeichen für die Proteinproben bestehen aus 4 Teilen:

1. einer Nummer, die identisch mit der des Serums vom gleichen Patienten ist;
2. einem Buchstaben: N für Normalnierenanteil einer Tumorniere,
T für Tumoranteil,
NN für nicht tumorös veränderte Niere;
3. einer Zahl, die angibt, aus welcher Fraktion der differentiellen Zentrifugation der Proteinextrakt gewonnen wurde (0 für die letzte Wasch-

flüssigkeit (vgl. 3.2.1.); 1 - 6 für die Sedimente S1 - S6, 7 für den Überstand Ü7 (vgl. Abb. 3.1.));

4. einem Buchstaben: S für PBS-lösliche Proteine,
X für Triton-X-100-lösliche Proteine (vgl. 3.2.3.).

Zum Schluß je ein Beispiel für eine Serum- und Proteinprobenbezeichnung:

03 Ig 2

bezeichnet die Immunglobulinfraktion der 2. Blutprobe des Probanden ohne Nierentumor, der die Nummer 03 erhielt;

03 NN 6X

bezeichnet die Probe mit den Triton-X-100-löslichen Proteinen aus dem Sediment S6 der tumorfreien Niere des selben Probanden.

4.2. Elektrophoretische Untersuchung der aus Nieren Gesunder und Karzinomen extrahierten Proteine

Nach der unter 3.2. beschriebenen Methode wurden 5 tumorbefallene und eine gesunde, ursprünglich für eine Transplantation vorgesehene Niere aufbereitet. Die Proteinproben wurden anschließend sowohl durch IFPAG als auch in der SDS PAGE aufgetrennt und die Bandenmuster verglichen.

4.2.1. Ergebnisse des IFPAG

Wegen der geringen Ionenkonzentration des Proben- und Gelpuffers traten Schwierigkeiten mit der Löslichkeit der Proteine auf. Die Proben mußten vor der Polymerisation in dem relativ großen Volumen des Gels gelöst werden.

Die zur Verfügung stehende Spannung von 650 V war gering, die in dem Elektrophoresegerät benötigte Menge an Elektrodenlösungen von je 50 ml relativ groß.

Da die verwendeten Gele sehr klein waren und nur eine geringe mechanische Stabilität wegen der niedrigen Acrylamidkonzentration aufwiesen, war es schwierig, sie direkt untereinander zu vergleichen. Deshalb wurden nur die Densitogramme der Gele ausgewertet.

Bei den in PBS gelösten Proteingemischen waren die Proteinbandenmuster der gleichen Fraktion des Normal- und Tumoranteils einer Niere ähnlich. Vereinzelt trat im Tumoranteil eine Bande auf, die im Normalanteil nicht sichtbar war. Der Normalanteil zeigte jedoch in der Regel mehr und auch schärfere Banden (Abb. 4.1., Abb. 4.2., Abb. 4.3. u. Abb. 4.4.).

Die in Triton-X-100 gelösten Proteingemische konnten im allgemeinen in wesentlich weniger Banden aufgetrennt werden als die PBS-löslichen (Abb. 4.6.). Proben vom Tumoranteil zeigten hier mehr Banden als Proben vom Normalnierenanteil (Abb. 4.5. u. Abb. 4.6.).

Sowohl bei PBS-löslichen als auch bei Triton-X-100-löslichen Proteinen wurden größere Unterschiede beobachtet, wenn man die selben Fraktionen verschiedener Nieren verglich, z.B.: 9N1S in Abb. 4.1. und 4N1S in Abb. 4.2.. Durch Einfrieren und Auftauen oder Aufbewahren bei 4°C wurden die Bandenmuster verändert, so daß zeitlich auseinanderliegende Läufe nicht verglichen werden konnten.

Nierenkarzinom von Normalnierengewebe auf Grund der Densitogramme zu unterscheiden, war nicht möglich. Es traten nämlich keine Banden auf, die sich nur im Tumor- oder Normalanteil aller untersuchten Nieren gezeigt hätten.

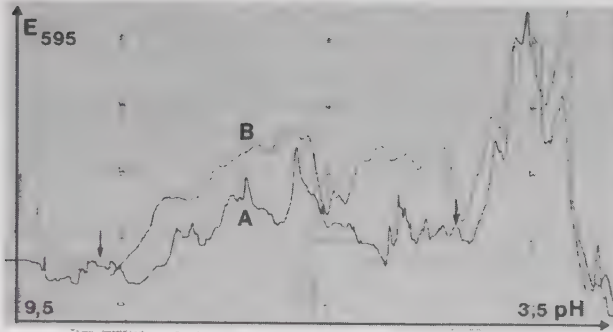


Abb. 4.1. Densitogramme von 2 IEF-Gelen
A: 9T1S (rote Kurve)
B: 9N1S (grüne Kurve)
→ : nur im Tumoranteil auftretende Banden

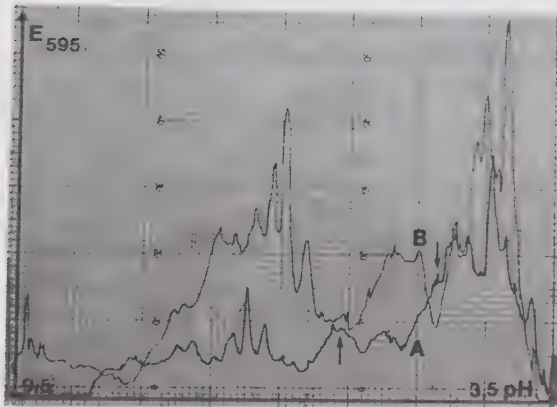


Abb. 4.2. Densitogramme von 2 IEF-Gelen
A: 4T1S (rote Kurve)
B: 4N1S (grüne Kurve)
→ : nur im Tumoranteil auftretende Banden

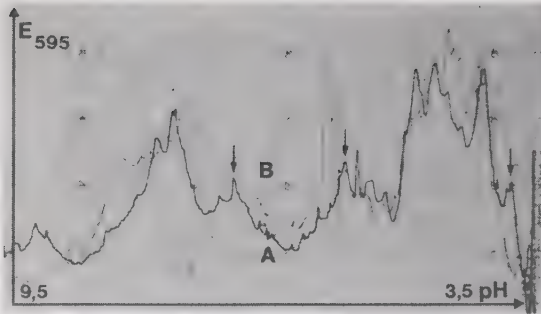


Abb. 4.3. Densitogramme von 2 IEF-Gelen

A: 7T2S (rote Kurve)

B: 7N2S (grüne Kurve)

→ : nur im Tumoranteil auftretende
Banden

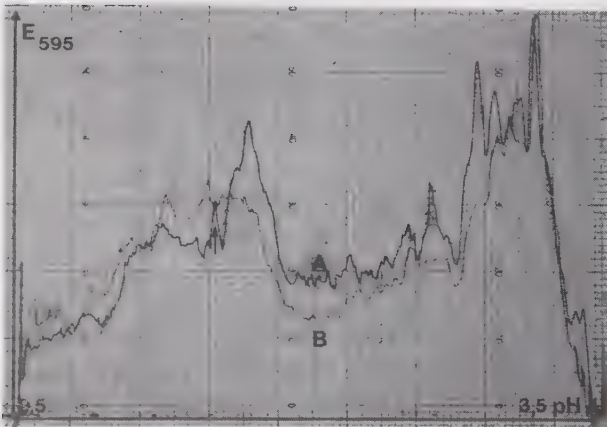


Abb. 4.4. Densitogramme von 2 IEF-Gelen

A: 7T3S (rote Kurve)

B: 7N3S (grüne Kurve)

→ : nur im Tumoranteil auftretende Banden

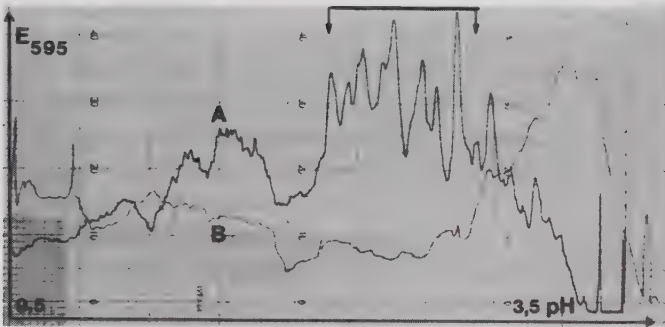


Abb. 4.5. Densitogramme von 2 IEF-Gelen

A: 7T1X (rote Kurve)

B: 7N1X (grüne Kurve)

↔ : nur im Tumoranteil auftretende Banden
c

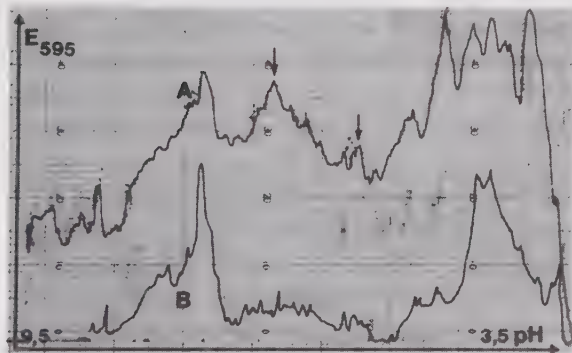


Abb. 4.6. Densitogramme von 2 IEF-Gelen

A: 7T2X (rote Kurve)

B: 7N2X (grüne Kurve)

→ : nur im Tumoranteil auftretende
Banden

Unterschiede in der Breite der Densitogramme in Abb. 4.1. - 4.6. resultieren aus unterschiedlicher Gellänge zwischen einzelnen Elektrophoreseläufen. Densitogramme in einer Abb. stammen immer von gleichlangen Gelen. Alle Gele sind mit Coomassie-Brilliant-Blau R 250 gefärbt.

4.2.2. Ergebnisse der SDS PAGE

Die PBS-löslichen Proteine mehrerer subzellulärer Fraktionen der drei Nierenkarzinome 4, 7 und 9 wurden in der SDS PAGE gemäß ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Zuerst wurden 12% und 7% Polyacrylamidgele benutzt und die Densitogramme verglichen. Im Molekulargewichtsbereich über 60.000 Dalton wurde mit 7,5% Gelen eine bessere Auftrennung erreicht, im Bereich unter 60.000 Dalton mit 12% Gelen.

Der Vergleich der Auftrennungen von gleichen Proben in verschiedenen, zeitlich auseinanderliegenden Läufen ergab hier wie in dem IFPAG Unterschiede, die allerdings nicht so groß waren wie dort. Die Anzahl der Banden und ihre relative Lage zueinander veränderten sich (vgl. 4N1S vom 6.9. und 4N1S vom 2.5.79 in Abb. 4.11.a.). Dies zeigte, daß Auftauen und Einfrieren oder Aufbewahren bei 4°C die Zusammensetzung der Proben beeinflusste.

Proben aus der Fraktion S1 des Normalnierenanteils zeigten kaum Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der Banden, jedoch in ihrer Intensität, wenn die drei Nieren untereinander verglichen wurden (Abb. 4.7.). Änderungen durch Einfrieren und Auftauen verliefen bei allen drei Nieren gleich, so daß zwar Unterschiede von Elektrophoreselauf zu Elektrophoreselauf aber nicht innerhalb eines Laufes auftraten. Bei den S1-Fraktionen der Tumoranteile war die Ähnlichkeit ebenfalls sehr groß. Neben quantitativen Unterschieden traten bei den einzelnen Karzinomen aber zusätzliche Banden auf, die nicht bei allen drei Nieren zu finden waren (Abb. 4.8.). Beim Vergleich der S1-Fraktion des Tumor- und Normalanteils der selben Niere fiel auf, daß der Normalanteil in mehr Banden aufgetrennt werden konnte. Nur 4T1S zeigte keine Unterschiede zu 4N1S (Abb. 4.9., Abb. 4.10., Abb. 4.11.).

Proben aus der Fraktion S2 verhielten sich ähnlich wie Proben aus S1. Bei allen drei Nieren traten im Tumoranteil im mittleren Molekulargewichtsbereich 1 - 2 zusätzliche Banden auf (Abb. 4.12.).

In der Fraktion S3 waren die Unterschiede zwischen Tumor- und Normalanteil größer. Im Karzinom trat regelmäßig eine Kombination von 3 - 4 Banden mit einem Molekulargewicht etwas kleiner als 60.000 Dalton wesentlich stärker hervor als im Normalnierenanteil (Abb. 4.13.).

Um eine bessere Auftrennung der Proben zu erreichen, wurden Rundgele hergestellt, deren Acrylamidkonzentration einem Gradienten folgte (vgl. 3.5.1.2.b u. Abb. 3.3.a - c). Die Verbesserung wurde erst bei der Vergrößerung der Gele sichtbar (Abb. 4.14. u. Abb. 4.15.). Wegen der Dichte der Banden konnte mit dem verwendeten Densitometer eine ausreichende Auflösung nicht erreicht werden. Ein direkter Vergleich der Vergrößerung brachte keine sicheren Ergebnisse, so daß die Gele ohne Vergrößerung ausgewertet wurden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß sich die Gradienten einzelner Röhrchen in einer Charge (= 18 Röhrchen) weitgehend gleich verhielten.

Abb. 4.16. bis Abb. 4.17. zeigen die elektrophoretische Auftrennung von einigen PBS-löslichen Proteinproben aus subzellulären Fraktionen. Zwischen der normalen Niere 1NN und den Tumornieren traten in allen Fraktionen Unterschiede auf. In der Fraktion 0 waren im Tumoranteil im mittleren Molekulargewichtsbereich zusätzliche Banden gegenüber 1NN und dem Normalanteil karzinombefallener Nieren sichtbar. In der Fraktion 5 trat im Tumoranteil eine zusätzliche Bande im niedermolekularen Bereich auf. Tumor- und Normalanteil waren sonst sehr ähnlich, läßt man quantitative Unterschiede unberücksichtigt. Lediglich in der Fraktion 3 variierten die Bandenmuster zwischen den einzelnen Nieren stärker.

Wurden Triton-X-100-lösliche Proteine in gleicher Weise wie PBS-lösliche für die SDS PAGE vorbereitet, so

konnten entweder keine oder nur 3 - 4 sehr breite, unscharf begrenzte Banden gefunden werden. Nur wenn auf Dialyse verzichtet wurde und die Proteine statt dessen mit TCA ausgefällt wurden, gelang eine befriedigende Auftrennung. Dabei gingen jedoch große Proteinmengen verloren. Die besten Resultate wurden erzielt, wenn die Proteinproben lyophilisiert und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgelöst wurden. War die ursprüngliche Proteinkonzentration gering, so traten durch Lyophilisieren hohe NaCl-Konzentrationen auf, die die Auftrennung in der SDS PAGE beeinträchtigten (Abb. 4.14.).

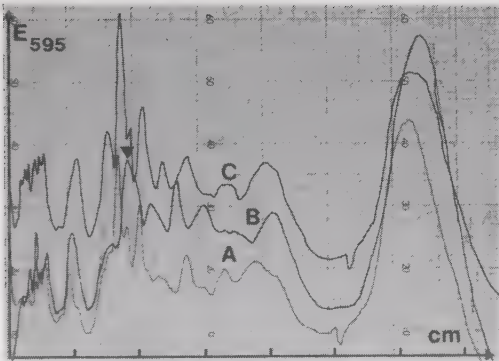


Abb. 4.7. Densitogramme von 3 SDS PAGE-Gelen

A: 7N1S (rote Kurve)

B: 4N1S (grüne Kurve)

C: 9N1S (schwarze Kurve)

→ : Bande in 4N1S, die in 7N1S in 3 Banden () aufgeteilt ist

7,5% Rundgele, Elektrophorese vom

9.6.79, Coomassie-Färbung

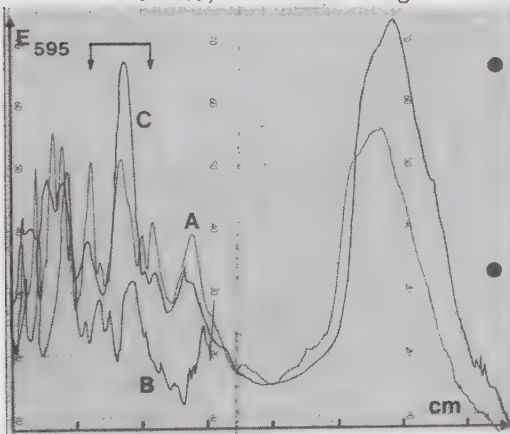


Abb. 4.8. Densitogramme von 3 SDS PAGE-Gelen

A: 9T1S (rote Kurve)

B: 4T1S (grüne Kurve)

C: 7T1S (schwarze Kurve)

⌈ : Bereich, in dem sich 9T1S, 4T1S und 7T1S unterscheiden

12% Rundgele, Elektrophorese vom 28.6.79, Coomassie-Färbung, bei Gel B brach die 2. mit den anderen Gelen identische Hälfte ab

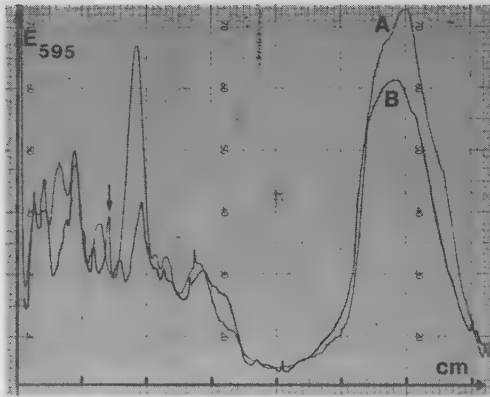


Abb. 4.9. Densitogramme von 2 SDS PAGE-Gelen
 A: 7T1S (rote Kurve)
 B: 7N1S (grüne Kurve)
 → : zusätzliche Bande im Normal-
 anteil
 12% Rundgele, Elektrophorese vom
 28.6.79, Coomassie-Färbung

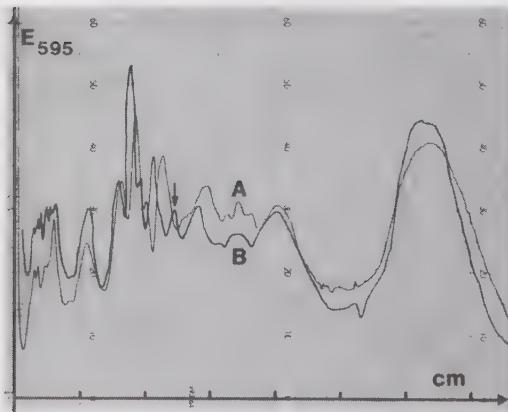


Abb. 4.10. Densitogramme von 2 SDS PAGE-Gelen
 A: 9T1S (rote Kurve)
 B: 9N1S (grüne Kurve)
 → : zusätzliche Bande im Normal-
 anteil
 7,5% Rundgele, Elektrophorese vom
 9.6.79, Coomassie-Färbung

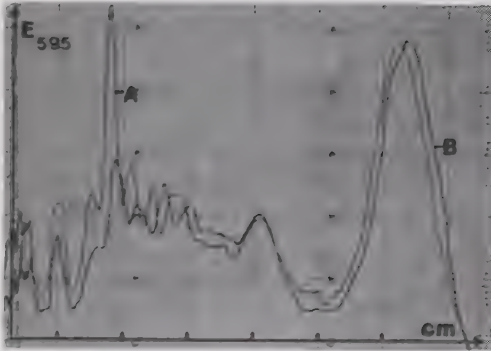


Abb. 4.11. Densitogramme von 2 SDS PAGE-Gelen

A: 4T1S (rote Kurve)

B: 4N1S (grüne Kurve)

7,5% Rundgele, Elektrophorese vom 9.6.79, Coomassie-Färbung

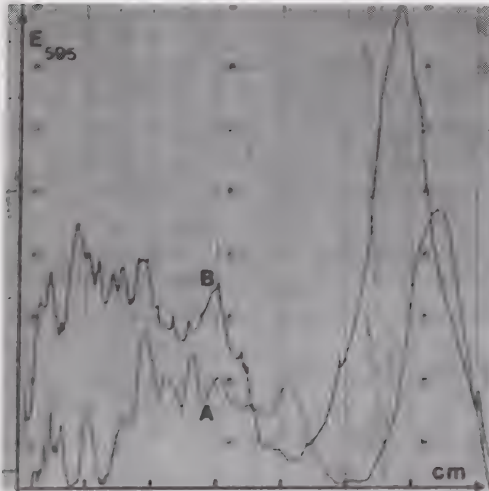


Abb. 4.11.a. Densitogramme von 2 SDS PAGE-Gelen

A: 4N1S (rote Kurve) Elektrophorese vom 9.6.79

B: 4N1S (grüne Kurve) Elektrophorese vom 2.5.79

Unterschiede im Bandenmuster sind über das ganze Gel verteilt, 7,5% Rundgele, Coomassie-Färbung

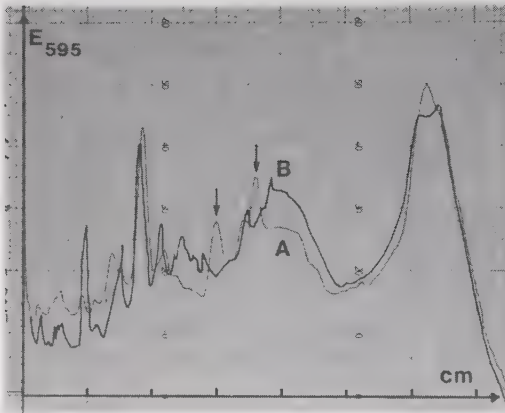


Abb. 4.12. Densitogramme von 2 SDS PAGE-Gelen
A: 7T2S (rote Kurve)
B: 7N2S (grüne Kurve)
→ : zusätzliche Banden im Tumoranteil
7,5% Rundgele, Elektrophorese vom
9.6.79, Coomassie-Färbung

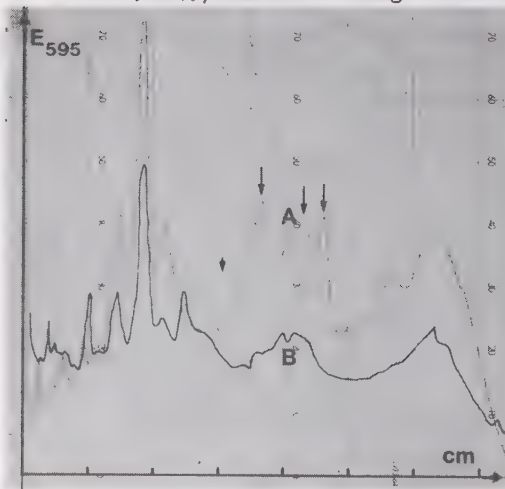


Abb. 4.13. Densitogramme von 2 SDS PAGE-Gelen
A: 7T3S (rote Kurve)
B: 7N3S (grüne Kurve)
→ : im Tumoranteil wesentlich
deutlicher auftretende Banden
7,5% Rundgele, Elektrophorese vom
9.6.79, Coomassie-Färbung

Legende zu Abb. 4.14. und Abb. 4.15.(S.50):

Gradientenrundgele, Gradient wie Abb. 3.3.b., 4% - 24%
Coomassie-Brilliant-Blau R 250 Färbung

in den Gelen b und o wurden lyophilisierte und in Probenpuffer
gelöste 7T1X-Proben aufgetrennt, in den restlichen Gelen TCA-
gefällte Proben (vgl. 3.5.1.1.)

a: 4N6X 200 ug Protein
b: 7T1X 200 ug Protein
c: 9N1X 200 ug Protein
d: 9N1X 100 ug Protein
e: 9N1X 50 ug Protein
f: 9T1X 200 ug Protein
g: 9T1X 100 ug Protein
h: 9T1X 50 ug Protein
i: 9T6X 200 ug Protein
j: 9T6X 100 ug Protein
k: 9T6X 50 ug Protein
l: 7T2X 200 ug Protein
m: 2T2X 100 ug Protein
n: 7T2X 50 ug Protein
o: 7T1X 100 ug Protein
p: 4N6X 100 ug Protein
q: 4N6X 50 ug Protein

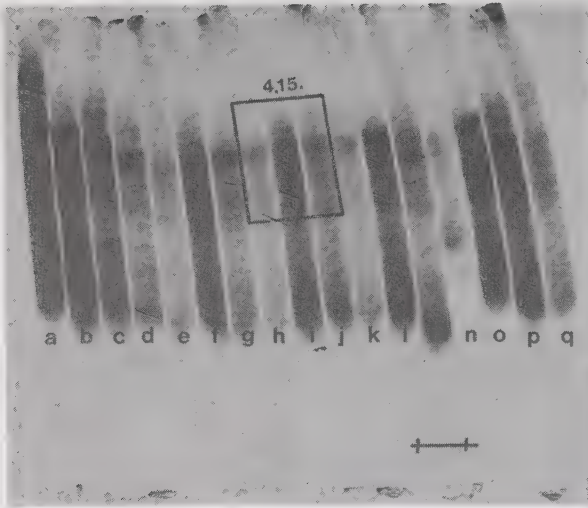


Abb. 4.14. SDS PAGE-Gele, 4.15.: in Abb. 4.15. gezeigter Ausschnitt, 1 cm
Legende s.S. 49

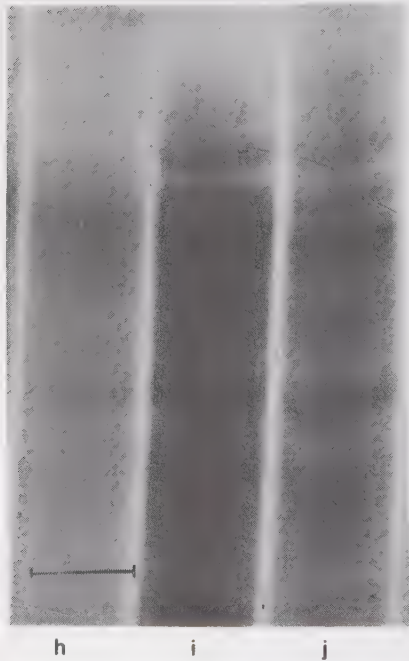


Abb. 4.15. Ausschnitt aus
Abb. 4.14.
0,5 cm
Legende s.S. 49

Legende zu Abb. 4.16. (S.52)

Gradientenrundgele, Gradient vgl. Abb. 3.3.b., 4% - 24%
Coomassie-Brilliant-Blau R 250 Färbung
9T2S - 1NN5S und 9T3S - 1NN1S je ein Lauf

- : Banden, die nur in Proben aus Normal- und Tumoranteil karzinombefallener Nieren, nicht aber in der tumorfreien Niere auftreten
- : Banden, die nur in Proben aus dem Tumoranteil auftreten

Legende zu Abb. 4.17. (S.53)

Gradientenrundgele,
9T7S - 1NN7S, 1NN5S - 1NN3S u. 9T1S - 1NN1S Gele aus einem Lauf mit einem Gradienten wie in Abb. 3.3.b.,
9T6S - 1NN6S, 9T2S - 1NN2S u. 9TOS - 1NNOS Gele aus einem Lauf mit einem Gradienten wie in Abb. 3.3.c.

- : Banden, die nur in Proben aus Normal- und Tumoranteil karzinombefallener Nieren, nicht aber in der tumorfreien Niere auftreten
- : Banden, die nur in Proben aus dem Tumoranteil auftreten

Abb. 4.16. SDS PAGE-Gele, Legende s.S.51

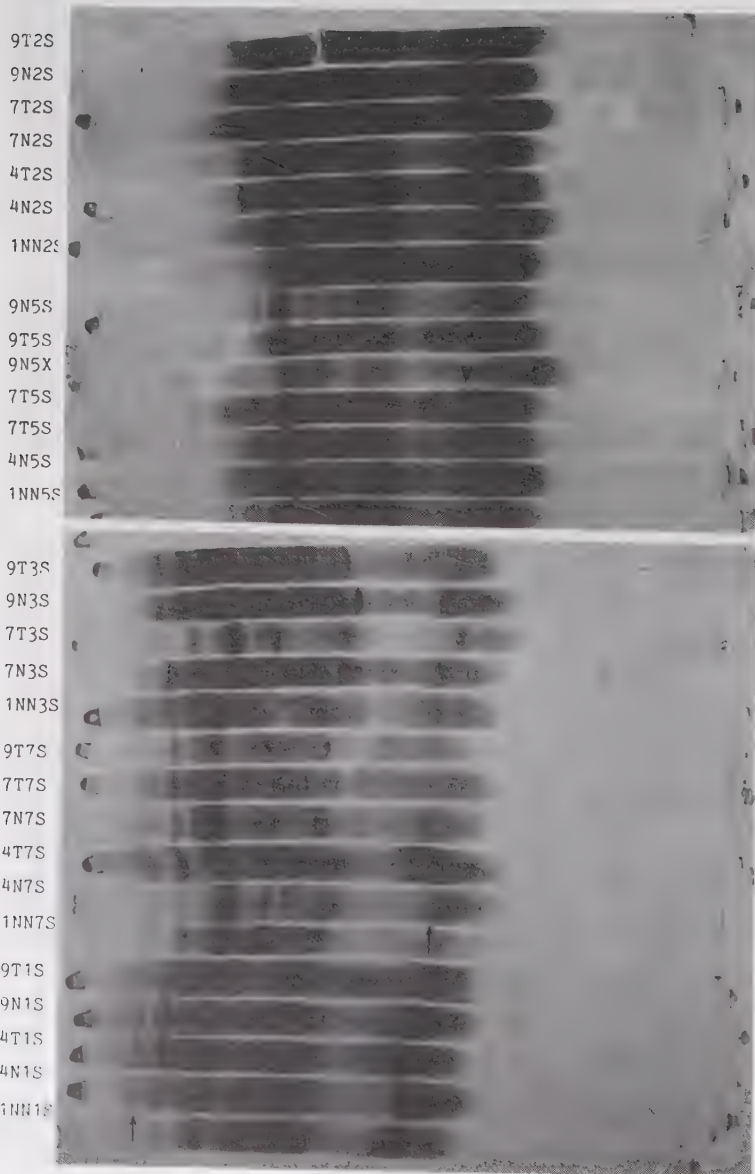


Abb. 4.17. SDS PAGE-Gele, Legende s.S.51

9T7S
7T7S
4T7S
7N7S
~~4N7S~~
1NN7S

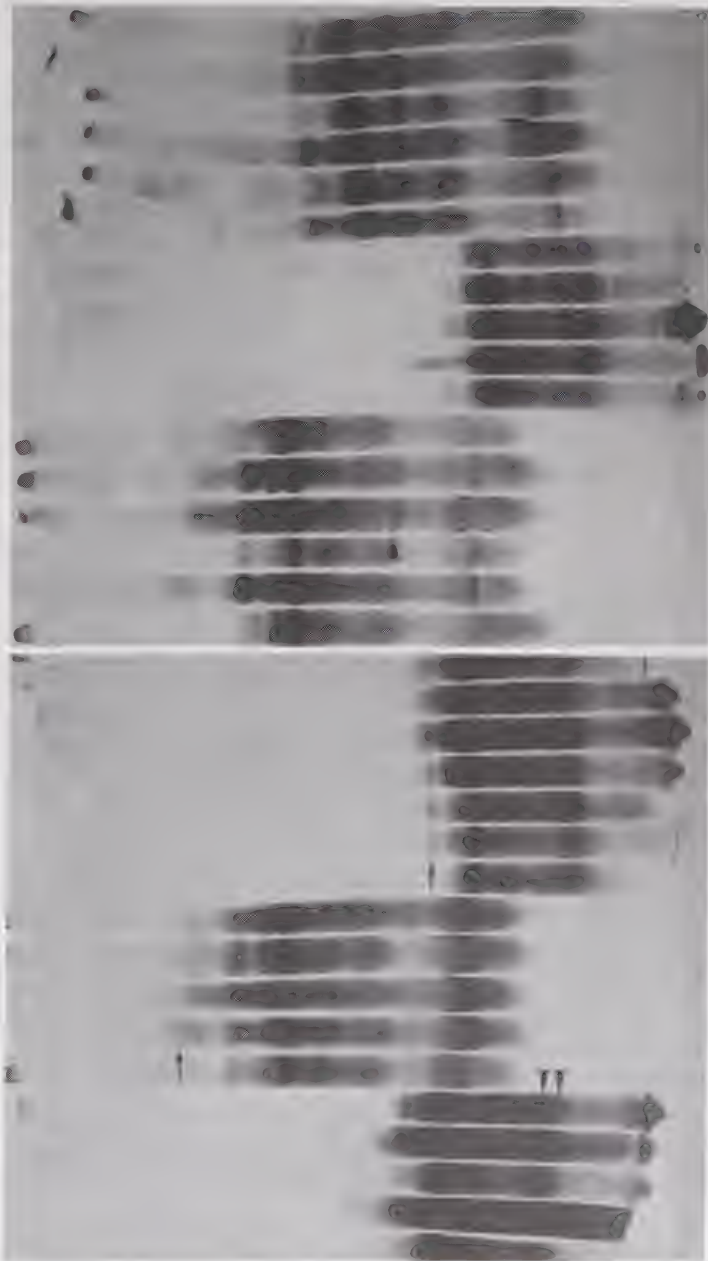
9T6S
~~4T6S~~
7N6S
4N6S
1NN6S

1NN5S
9T3S
7T3S
9N3S
7N3S
1NN3S

9T2S
7T2S
4T2S
9N2S
7N2S
4N2S
1NN2S

9T1S
4T1S
9N1S
4N1S
1NN1S

~~4T0S~~
7T0S
9N0S
7N0S
1NN0S



4.3. Immunologische Untersuchungen

Mit Immundoppeldiffusion und Gegenstromelektrophorese wurde untersucht, ob sich in den getesteten Seren Antikörper gegen Antigene in den Proteinproben befanden, die mit ihnen präzipitierende Antigen-Antikörper-Komplexe bildeten. Eine Austestung aller möglichen Proteinproben-Seren-Kombinationen war wegen der begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden Materials nicht möglich. Vor allem die Proteinmenge der subzellulären Fraktionen S3, S5 und S6 war relativ gering. Daneben reichten die Volumina der Testseren nicht für eine alle Kombinationsmöglichkeiten berücksichtigende Untersuchung aus.

4.3.1. Immundoppeldiffusion

Die in Abb. 3.5. gezeigten Dimensionen der Testplatten und die in Abschnitt 3.6.2. angegebenen Volumina für Proteinproben und Seren erwiesen sich als am günstigsten.

Welche Seren gegen welche Proteinproben getestet wurden, ist aus den Tabellen 4.1. und 4.2. zu ersehen. Nur in wenigen Fällen traten Präzipitationslinien auf. Oft konnten sie nicht jedesmal beobachtet werden, wenn Versuche wiederholt wurden. So bei den Kombinationen 3T2S/4Ig, 3T3S/4Ig, 3T2S/3Ig, 3T3S/3Ig, wo sich deutliche Doppellinien zeigten (Abb. 4.18.). Dabei gingen die Präzipitationslinien von 3T2S und 3T3S ineinander über. Ein Vergleich zwischen 4Ig und 3Ig - ob es sich um identische Antigene handelte - wäre interessant gewesen, zumal 3Ig eine autologe Immunglobulinfraktion war. Die Präzipitate traten bei Wiederholung der Versuche aber nicht mehr auf.

15Se3 bildete mit 3N2S, 3N3S und 3N5S regelmäßig Präzipitate, auch wenn die Proteinproben 1:2 mit PBS verdünnt wurden. Bei einer 1:2-Verdünnung des Serums verschwanden sie. Unverdünnt traten auch zwischen

3T2S und 15Se3 Präzipitate auf. Bei 15Se1 und 15Se2 fanden sich keine Präzipitate (Abb. 4.20.).

Die löslichen Proteine aus den subzellulären Fraktionen der Nierenkarzinome 4, 7 und 9 wurden hauptsächlich gegen autologe Seren und Immunglobulinfraktionen getestet (Tab. 4.2.). Dabei zeigten sich drei unterschiedliche Reaktionen.

1. 4Ig bildete - auch in 1:2-Verdünnung mit PBS - mit Proteinproben aus mehreren Fraktionen des autologen Tumors deutliche Präzipitate (Abb. 4.19.). Neben der überwiegenden Reaktion mit Proteinproben aus dem Tumoranteil ergaben sich auch gegen einzelne subzelluläre Fraktionen des Normalanteils Präzipitationslinien.
2. 9Se reagierte nur mit der Probe 9T6S, 9Ig mit keiner Proteinprobe aus dem autologen Nierenkarzinom.
3. 7Se und 7Ig zeigten keine Präzipitationslinien gegen den eigenen Tumor- oder Normalnierenanteil.

Die Proteinkonzentration der Proben spielte eine untergeordnete Rolle. Bei 4T5S (0,013 mg/ml) war eine Präzipitationslinie gegen 4Ig zu sehen, bei 4T5X (1,66 mg/ml) nicht. Proteinproben aus den gleichen subzellulären Fraktionen verschiedener Nieren hatten ähnliche Proteinkonzentrationen (z.B.: 9N1S 5,09 mg/ml, 7N1S 7,9 mg/ml, 4N1S 2,9 mg/ml).

Bei homologen Seren oder Immunglobulinfraktionen fanden sich keine Präzipitate. 2BH₂S₁, ein Proteinextrakt aus einem Melanom, der in der Gegenstromelektrophorese sehr deutlich mit fast allen Seren reagierte (Abb. 4.26.), bildete in der Immundoppeldiffusion keine Präzipitate gegen 4Ig, 7Ig und 9Ig.

	1Ig	2Se	3Ig	4Ig	7Se	9Se	11Se	12Se1	12Se2	13Se1	13Se2	14Se1	14Se3	15Se1	15Se2	15Se3	02Se	04Se	05Se
2N2S	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0
2T2S	-	-	+	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	-	-	-
2N3S	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0
2T3S	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	-	-	-
2N5S	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0
2T5S	0	-	+	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-
2N6S	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0
2T6S	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	0	-	-	-
2N7S	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	0
2T7S	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	0	-	0	0	-	-	-
3N2S	-	0	-	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3T2S	-	-	+	+	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3N3S	-	0	-	-	0	0	0	0	+	0	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3T3S	+	-	+	+	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3N5S	-	0	-	-	0	0	0	0	+	0	-	-	+	-	-	+	0	0	0
3T5S	+	-	-	+	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2BH ₂ S ₁	-	0	-	-	-	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 4.1. Übersicht über die Ergebnisse von Immundoppeldiffusionsversuchen mit Proteinen aus den Tumoren 2 u. 3

+ : Immunpräzipitat sichtbar
 - : kein Immunpräzipitat sichtbar
 0 : Paarung wurde nicht getestet

	<u>T U M O R</u>											
	4			7					9			
	4Ig	7Ig	9Ig	4Ig	7Se	7Ig	9Ig	10Ig	7Ig	9Se	9Ig	10Ig
NOS	0	0	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
TOS	0	0	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
N1S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1X	+	-	-	0	0	-	-	-	-	0	-	-
T1S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1X	+	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-
N2S	-	-	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
N2X	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
T2S	-	-	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
T2X	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
N3S	+	-	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0
N3X	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
T3S	+	-	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
T3X	+	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
N5S	-	-	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
N5X	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
T5S	+	-	0	0	-	-	0	0	0	-	-	0
T5X	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
N6S	-	-	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0
N6X	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0
T6S	+	-	-	0	0	0	0	0	0	+	-	0
T6X	+	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N7S	-	-	0	0	-	-	-	-	0	-	-	0
T7S	+	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
2BH ₂ S ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 4.2. Übersicht über die Ergebnisse von Immundoppeldiffusionsversuchen mit Proteinen aus den Tumoren 4, 7 und 9

+ : Immunpräzipitat sichtbar
 - : kein Immunpräzipitat sichtbar
 0 : Paarung wurde nicht getestet

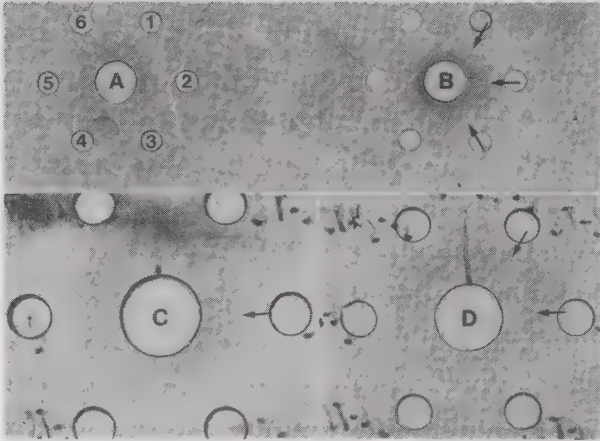


Abb. 4.18. Immundoppeldiffusion von Immunglobulinfraktionen aus Patientenserum gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

A: 13Se1	1:	3T2S	B: 4Ig	1:	3T2S
	2:	3T3S		2:	3T3S
	3:	3T5S		3:	3T5S
	4:	2T2S		4:	2T2S
	5:	2T5S		5:	2T5S
	6:	2BH ₂ S ₁		6:	2BH ₂ S ₁
C: 1Ig	1:	3T2S	D: 3Ig	1:	3T2S
	2:	3T3S		2:	3T3S
	3:	3T5S		3:	3T5S
	4:	2T2S		4:	2T2S
	5:	2T5S		5:	2T5S
	6:	2BH ₂ S ₁		6:	2BH ₂ S ₁

→: Präzipitationslinien
 bei 1Ig und 3Ig sind die Präzipitationslinien nur sehr schwach ausgebildet

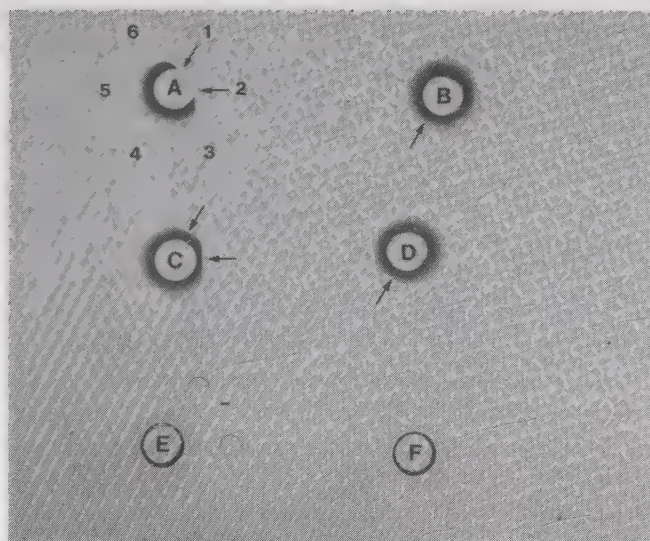


Abb. 4.19. Immundoppeldiffusion von Immunglobulinfraktionen gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

A: 4Ig	1: 4N1S	B: 4Ig	1: 4N5S
	1:2 mit 2: 4T1S		1:2 mit 2: 4T5S
	PBS ver- 3: 4N2S		PBS ver- 3: 4N6S
	dünnt 4: 4T2S		dünnt 4: 4T6S
	5: 4N3S		5: 4N7S
	6: 4T3S		6: 4T7S
C: 4Ig	1: 4N1X	D: 4Ig	1: 4N5X
	1:2 mit 2: 4T1X		1:2 mit 2: 4T5X
	PBS ver- 3: 4N2X		PBS ver- 3: 4N6X
	dünnt 4: 4T2X		dünnt 4: 4T6X
	5: 4N3X		5: 7N1S
	6: 4T3X		6: 7T1S
E: 7Ig	1: 7N1X	F: 7Ig	1: 7N5S
	1:4 mit 2: 7T1S		1:4 mit 2: 7T5S
	PBS ver- 3: 7N2S		PBS ver- 3: 7N6S
	dünnt 4: 7T2S		dünnt 4: 7TOS
	5: 7N3S		5: 7N7S
	6: 7T3S		6: 7T7S

→: Präzipitationslinien

Da das Gel nach der Immundoppeldiffusion nicht in einem PBS-Bad differenziert wurde, ist der Bereich zwischen Präzipitat und zentralem Loch stark angefärbt.

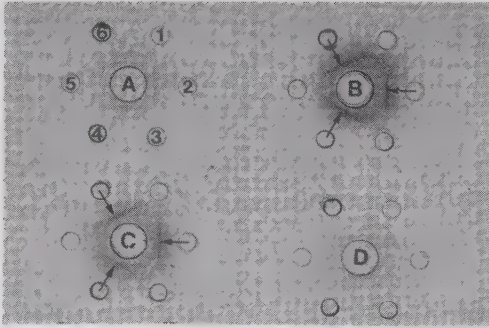


Abb. 4.20. Immundoppeldiffusion von Patientenserum gegen Proteinproben aus einem Nierenkarzinom

A: 15Se3	1: 3T2S	B: 15Se3	1: 3T2S	1:2 mit PBS verdünnt	
1:2 mit	2: 3N2S		2: 3N2S	1:2 mit PBS verdünnt	
PBS ver-	3: 3T3S		3: 3T3S	1:2 mit PBS verdünnt	
dünnt	4: 3N3S		4: 3N3S	1:2 mit PBS verdünnt	
	5: 3T5S		5: 3T5S	1:2 mit PBS verdünnt	
	6: 3N5S		6: 3N5S	1:2 mit PBS verdünnt	
C: 15Se3	1: 3T2S	1:4 mit PBS verdünnt	D: 15Se2	1: 3T2S	
	2: 3N2S	1:4 mit PBS verdünnt		2: 3N2S	
	3: 3T3S	1:4 mit PBS verdünnt		3: 3T3S	
	4: 3N3S	1:4 mit PBS verdünnt		4: 3N3S	
	5: 3T5S	1:4 mit PBS verdünnt		5: 3T5S	
	6: 3N5S	1:4 mit PBS verdünnt		6: 3N5S	

→ : Präzipitationslinie von 15Se3
gegen 3T2S,
mit PBS verdünntes 15Se3 bildet nur
ganz schwache Präzipitationslinien,
15Se2 zeigt keine Reaktion;

4.3.2. Gegenstromelektrophorese

Die auftretenden Präzipitate konnten nur durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar gemacht werden und waren auch dann oft nur bei Vergrößerung sichtbar (Abb. 4.23.). Serumproteine, die zur Kathode wanderten, überlagerten beim Anfärben die Präzipitationslinien. Sie konnten auch durch mehrtägiges Waschen in PBS mit 0,5% Triton-X-100 nicht völlig beseitigt werden. Vor ihrem Hintergrund waren die Präzipitate manchmal schwer zu identifizieren, zumal Serumproteine oft unspezifische präzipitatähnliche Linien bildeten (Abb. 4.34.). Durch Änderung des pH-Wertes im Gel und in den Elektrodenpuffern von 8,6 auf 8,2 wurde erreicht, daß die Präzipitate mehr in der Mitte zwischen den Auftragstellen von Antigen und Antiserum zu liegen kamen und dadurch eindeutiger zu identifizieren waren. Die aufgetragenen Volumina variierten zwischen 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l und 60 μ l; das Volumen von Serum und Proteinprobe eines Paares war immer gleich. Volumen und Abstand zwischen Proteinproben- und Serumauftragstelle (vgl. Abb. 3.6.) spielten in der hier verwendeten Variationsbreite keine Rolle.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinproben aus den Tumoren 2 und 3 sind in Tab. 4.3. zusammengefaßt. Abb. 4.21. zeigt ein Beispiel für ein positiv und ein negativ reagierendes Serum. Auffällig sind die im Vergleich zur Immundoppeldiffusion häufigen positiven Ergebnisse.

15Se1 und 14Se1 zeigten im Gegensatz zur Doppeldiffusion Präzipitate gegen Fraktionen der Tumoren 2 und 3. Bei 14Se1 wurden Versuche mit einer Verdünnungsreihe des Serums angestellt. Gegen die Proben 2T2S, 2T3S und 2T5S verschwanden die Präzipitate ab einer Verdünnung des Serums von 1:4 mit PBS, während sie gegen 3T2S, 3T3S und 3T5S sichtbar blieben (Abb. 4.22.).

Gegen den autologen Tumor wurde nur 2Se getestet. Es zeigte wie in der Immundoppeldiffusion keine Präzipitate. Mit Seren tumorfreier Probanden wurden sowohl positive als auch negative Reaktionen beobachtet.

In Tab. 4.4. sind die Resultate der Gegenstrom-elektrophoresen von Proben aus den Tumoren 4, 7 und 9 gegen verschiedene Seren und Immunglobulinfraktionen zusammengefaßt. Sowohl Normal- als auch Tumoranteil der Nieren reagierten mit autologen Immunglobulinfraktionen. Die deutlicheren Präzipitate zeigten Proben des Normalanteils. Mit Triton-X-100 extrahierte Proteingemische enthielten, obwohl ihre Proteinkonzentration immer niedriger war, häufiger Antigene, die mit Antikörpern aus den Seren und Immunglobulinfraktionen Präzipitate bildeten, als in PBS mit Ultraschall gelöste. Reaktionen homologer Immunglobulinfraktionen von Nierenkarzinompatienten waren selten. Auch Seren tumorfreier Probanden bildeten teilweise Präzipitate gegen die Proteinproben aus den Nierentumoren.

BH_2S_1 , das eigentlich als Kontrollantigen diente, bildete mit fast allen getesteten Seren Präzipitate, die aber auf der Anodenseite der Serumaufragestelle lagen. PBS, PBS mit 0,5% Triton-X-100 und Humanalbumin zeigten gegen keines der getesteten Seren Präzipitate.

Auffällig war, daß fast alle Immunglobulinfraktionen und auch Seren von Nierentumorpatienten mit den Proben 9N1X und 9T1X Präzipitate bildeten, während von tumorfreien Probanden nur wenige positiv reagierten (vgl. auch Tab. 4.5. u. Abb. 4.33.). Deshalb wurden bei 9N1X und 9T1X wie unten in Abschnitt 4.4. ausgeführt, nähere elektrophoretische Untersuchungen der Präzipitate durchgeführt.

Die Präzipitationslinien verschwanden, wenn Seren bzw. Proteingemische mehrmals eingefroren oder aufgetaut wurden. Nachteilig erwies sich die im Gegensatz zur Immundoppeldiffusion schlechte Vergleichbarkeit der Präzipitate, so daß nicht entschieden werden konnte, ob

ähnliche oder gleiche Antigene und Antikörper daran beteiligt waren.

Beispiele für Gegenstromelektrophoresen mit Proteinproben aus den Tumoren 4, 7 und 9 sind in Abb. 4.23. bis Abb. 4.26. dargestellt.

4.3.3. Mikroimmundoppeldiffusion und Mikrogegenstrom-elektrophorese

Die in der Immundoppeldiffusion und in der Gegenstromelektrophorese gefundenen Ergebnisse wurden mit den beiden Mikromethoden (vgl. 3.6.4.) zum Teil bestätigt. Darüber hinausgehende Resultate konnten trotz der höheren Empfindlichkeit der Methode nicht gewonnen werden. Abb. 4.27. zeigt ein Beispiel für die Mikrogegenstromelektrophorese.

4.3.4. Immunfluoreszenzmarkierung von Präzipitaten aus der Gegenstromelektrophorese

Um die Beteiligung von Immunglobulinen an den Präzipitaten der Gegenstromelektrophorese nachzuweisen, wurde versucht, sie mit fluoresceinkonjugierten Anti-Human-Immunglobulin-G-Antikörpern zu markieren (vgl. 3.6.5.). Wurden die Antikörper wie in 3.6.5. beschrieben auf das Gel gebracht, so war auch nach mehrtägigem Differenzieren entweder eine diffuse Hintergrundfluoreszenz sichtbar, die kein Hervortreten des Präzipitates erkennen ließ, oder es war keine Fluoreszenz sichtbar, wenn die Antikörperlösung stärker verdünnt wurde (ab einer Verdünnung von etwa 1:128).

Unterzog man das Gel einer 2. Elektrophorese in gleicher Richtung mit fluoresceinkonjugierten Antikörpern in den beiden Auftragestellen eines Paares, so zeigte sich bei UV-Licht-Betrachtung etwa das gleiche Bild wie in dem mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten

Gel in Abb. 4.28.. Die fluoresceinkonjugierten Antikörper ließen sich nicht mehr ausreichend aus dem Gel waschen. Die Präzipitate der 1. Elektrophorese (Gegenstromelektrophorese zwischen Proteinprobe und Serum) verschwanden zwar nach der 2. Elektrophorese nicht, sie traten aber auch nicht gegenüber der starken Hintergrundfluoreszenz hervor. Es gelang deshalb nicht, die Präzipitationslinie durch indirekte Fluoreszenzmarkierung sichtbar zu machen.

	1H8	2Sa	132a1	145a1	152a1	042a	052a
2N2S	0	0	+	0	0	0	+
2T2S	0	0	+	0	+	0	+
2N3S	+	0	+	+	+	0	+
2T3S	-	-	+	+	+	-	+
2N5S	+	0	+	+	+	0	+
2T5S	-	0	+	+	+	-	+
2N6S	+	0	+	+	+	0	+
2T6S	-	-	+	+	+	0	+
3N2S	0	0	+	+	0	0	0
3T2S	0	0	+	+	+	0	0
3N3S	+	0	+	+	+	-	0
3T3S	-	-	+	+	+	-	0
3N5S	+	0	+	+	+	-	0
3T5S	-	0	+	+	+	-	0
3T6S	0	-	0	0	0	0	0
X-100	-	-	-	-	-	-	-
PBS	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 4.3. Übersicht über die Ergebnisse von Gegenstromelektrophoreseversuchen mit Proteinen aus den Tumoren 2 u. 3

+ : Immunpräzipitat sichtbar
 - : kein Immunpräzipitat sichtbar
 0 : Paarung wurde nicht getestet

Legende zu Tab. 4.4. S.66

+ : Immunpräzipitat sichtbar
 - : kein Immunpräzipitat sichtbar
 ? : Immunpräzipitat nicht eindeutig beurteilbar
 0 : Paarung wurde nicht getestet

	T U M O R														
	4					7					9				
	4Ig	7Ig	9Ig	10Ig	03Se	7Ig	9Ig	10Ig	03Se	05Se	7Ig	9Ig	03Se	06Se	
NOS	0	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	-	0	0	
TOS	0	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	-	0	0	
N1S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N1X	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
T1S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
T1X	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	
N2S	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	
N2X	+	-	-	+	-	+	-	0	0	+	+	-	0	-	
T2S	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	
T2X	+	-	-	?	-	+	-	0	0	+	-	-	0	-	
N3S	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	
N3X	+	-	-	+	-	-	-	0	0	+	0	0	0	0	
T3S	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	
T3X	-	-	-	?	-	-	-	0	0	+	-	-	0	-	
N5S	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	
N5X	+	-	-	+	-	+	-	0	0	-	-	-	0	-	
T5S	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	
T5X	+	-	-	+	-	+	-	0	0	-	-	-	0	-	
N6S	-	-	-	+	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	
N6X	?	+	-	+	-	-	-	0	0	-	0	0	0	0	
T6S	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	-	-	0	-	
T6X	?	+	-	+	-	0	0	0	0	0	-	+	0	-	
N7S	-	-	-	+	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	
T7S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	
2BH ₂ S ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
X-100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tab. 4.4. Übersicht über die Ergebnisse von Gegenstromelektrophoreseversuchen mit Proteinen aus den Tumoren 4, 7 u. 9
Legende s. S.65

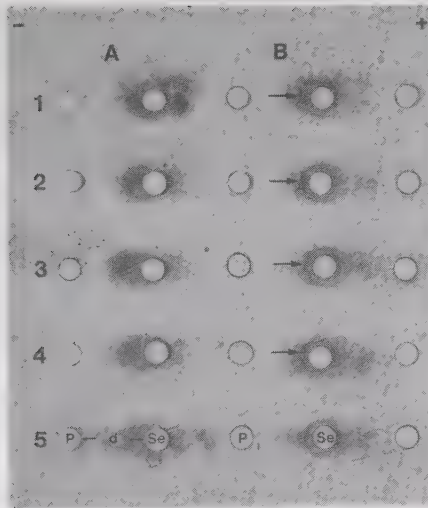


Abb. 4.21. Gegenstromelektrophorese von Patientenserum gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

A		B	
Probe	Serum	Probe	Serum
1: 2T3S	2Se	<u>2T3S</u>	<u>13Se1</u>
2: 2T6S	2Se	<u>2T6S</u>	<u>13Se1</u>
3: 3T3S	2Se	<u>3T3S</u>	<u>13Se1</u>
4: 3T5S	2Se	<u>3T5S</u>	<u>13Se1</u>
5: 3V/76	2Se	<u>3V/76</u>	<u>13Se1</u>

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen;

3V/76: nicht näher definierbarer Proteinextrakt aus einem Nierenkarzinom;

→ : Präzipitationslinien
2Se bildet mit keiner Probe Präzipitate, 13Se1 mit allen außer 3V/76.

Se: Serumauftragstellen
P : Probenauftragstellen
+ : Anodenseite
- : Kathodenseite
d : 10 mm

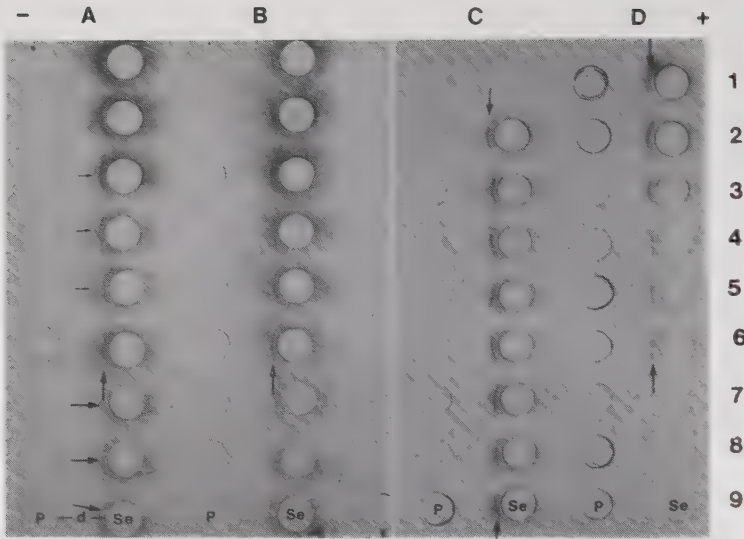


Abb. 4.22, Gegenstromelektrophorese von Patientenseren gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

A		B		C		D		
Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	
3T2S	14Se1	3N2S	14Se1	3T2S	15Se1	2T3S	15Se1	:1
3T3S	14Se1	3N3S	14Se1	3T2S	15Se1	2T5S	15Se1	:2
3T2S	14Se1	3N5S	14Se1	3T3S	15Se1	2T5S	15Se1	:3
3T5S	14Se1	3N2S	14Se1	3T3S	15Se1	2T2S	14Se1	:4
3T3S	14Se1	3N3S	14Se1	3T5S	15Se1	2T3S	14Se1	:5
3T5S	14Se1	3N5S	14Se1	3T5S	15Se1	2T5S	14Se1	:6
3T2S	14Se1	3N2S	14Se1	2T2S	15Se1	2T2S	14Se1	:7
3T3S	14Se1	3N3S	14Se1	2T2S	15Se1	2T3S	14Se1	:8
3T5S	14Se1	3N5S	14Se1	2T3S	15Se1	2T5S	14Se1	:9

→: Präzipitationslinie, →: 2. Präzipitationslinie,
 Se: Serumaufragestellen, P: Probenauftragstellen, d: 7 mm,
 - : Kathodenseite, + : Anodenseite, 1:2, 1:4: 1:2 bzw. 1:4 mit
 PBS verdünnt;
 bei 3T2S - 3T5S gegen 14Se1 1:4 sind in der Abb. die Präzipita-
 te kaum zu sehen.

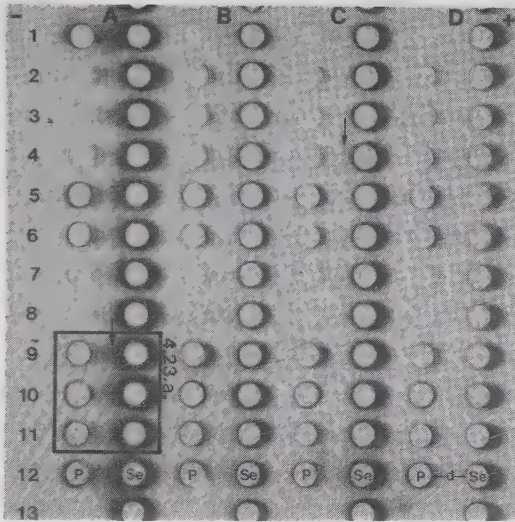


Abb. 4.23. Gegenstromelektrophorese von Immunglobulinfraktionen aus Patientenserum gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

4.23.a.: in Abb. 4.23.a. dargestellter Ausschnitt

Legende s.S.70

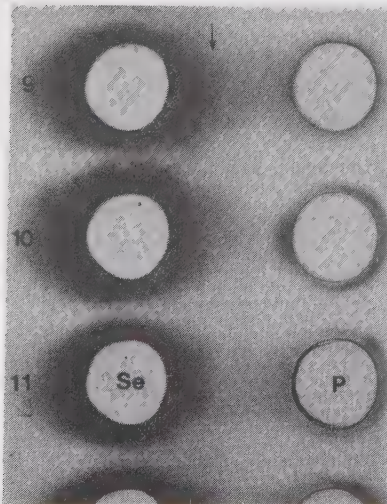


Abb. 4.23.a. Ausschnitt aus Abb. 4.23.

Legende s.S.70

Legende zu Abb. 4.23. u. Abb. 4.23.a. s. S.69

in Abb. 4.23.a. ist das Gel spiegelbildlich verkehrt zu dem Gel in Abb. 4.23. abgebildet;

A		B		C		D	
Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum
1: 7N1S	9Ig	7N1S	9Ig	7N1S	7Ig	7N1S	7Ig
2: 7T1S	9Ig	7T1S	9Ig	7T1S	7Ig	7T1S	7Ig
3: 7N1X	9Ig	7N1X	9Ig	7N1X	7Ig	7N1X	7Ig
4: 7T1X	9Ig	7T1X	9Ig	7T1X	7Ig	7T1X	7Ig
5: 7N7S	9Ig	7N7S	9Ig	7N7S	7Ig	7N7S	7Ig
6: 7T7S	9Ig	7T7S	9Ig	7T7S	7Ig	7T7S	7Ig
7: 9N1S	9Ig	9N1S	9Ig	9N1S	7Ig	9N1S	7Ig
8: 9T1S	9Ig	9T1S	9Ig	9T1S	7Ig	9T1S	7Ig
9: 9N1X	9Ig	9N1X	9Ig	9N1X	7Ig	9N1X	7Ig
10: 9T1X	9Ig	9T1X	9Ig	9T1X	7Ig	9T1X	7Ig
11: 9T7S	9Ig	9T7S	9Ig	9T7S	7Ig	9T7S	7Ig
12: 2BH ₂ S ₁	9Ig	2BH ₂ S ₁	9Ig	2BH ₂ S ₁	7Ig	2BH ₂ S ₁	7Ig
13: N11	9Ig	N11	9Ig	N11	7Ig	N11	7Ig

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen, in Spalte B u. D sind 9Ig u. 7Ig 1:2 mit PBS verdünnt; in der abgebildeten Gegenstromelektrophorese treten nur wenige Präzipitate auf; der Vergleich mit Tab. 4.4. (s.S.66) zeigt, daß Präzipitate nicht in jedem Elektrophoreseversuch auftreten, so ist hier bei der Paarung 9T1X/9Ig kein Präzipitat sichtbar; das Präzipitat bei 9N1X/9Ig ist nur in der Vergrößerung sichtbar.

Abkürzungen (Abb. 4.23. - Abb. 4.26.):

3V/76 : nicht näher definierbarer Proteinextrakt aus einem Nierenkarzinom,

N11 : nicht näher definierbarer Proteinextrakt aus einer gesunden Niere,

2BH₂S₁:

X100 : PBS mit 0,5% Triton-X-100

HA : Humanalbumin 10 mg/ml

Se : Serumaufragestellen

+ : Anodenseite

d : 6 mm

P : Probenaufragestellen

- : Kathodenseite

→: Präzipitationslinien

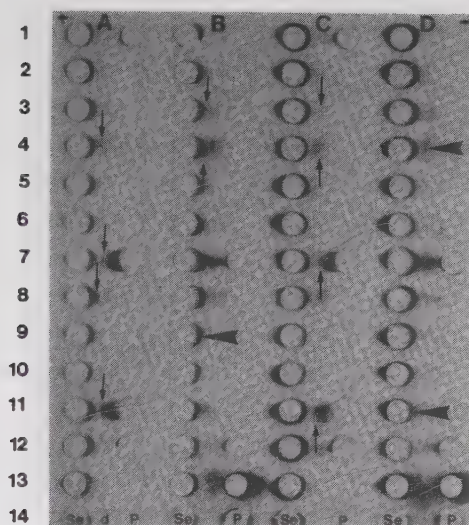


Abb. 4.24. Gegenstromelektrophorese von Immunglobulinfraktionen aus Patientenseren gegen Proteinproben eines Nierenkarzinomes

A		B		C		D	
Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe
1: 4Ig	4N1S	4Ig	4N5S	10Ig	4N1S	10Ig	4N5S
2: 4Ig	4T1S	4Ig	4T5S	10Ig	4T1S	10Ig	4T5S
3: 4Ig	4N1X	4Ig	4N5X	10Ig	4N1X	10Ig	4N5X
4: <u>4Ig</u>	<u>4T1X</u>	<u>4Ig</u>	<u>4T5X</u>	<u>10Ig</u>	<u>4T1X</u>	10Ig	4T5X
5: 4Ig	4N2S	4Ig	4N6S	10Ig	4N2S	10Ig	4N6S
6: 4Ig	4T2S	4Ig	4T6S	10Ig	4T2S	10Ig	4T6S
7: 4Ig	4N2X	4Ig	4N6X	10Ig	4N2X	10Ig	4N6X
8: <u>4Ig</u>	<u>4T2X</u>	4Ig	4T6X	10Ig	4T2X	10Ig	4T6X
9: <u>4Ig</u>	4N3S	4Ig	4N7S	10Ig	4N3S	10Ig	4N7S
10: 4Ig	4T3S	4Ig	4T7S	10Ig	4T3S	10Ig	4T7S
11: 4Ig	4N3X	4Ig	HA	<u>10Ig</u>	<u>4N3X</u>	10Ig	HA
12: <u>4Ig</u>	<u>4T3X</u>	4Ig	3V/76	10Ig	4T3X	10Ig	3V/76
13: 4Ig	PBS	4Ig	2BH ₂ S ₁	10Ig	PBS	10Ig	2BH ₂ S ₁
14: 4Ig	X100	4Ig	N11 ²	10Ig	X100	10Ig	N11 ²

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen, 4Ig u. 10 Ig sind 1:4 mit PBS verdünnt;

►: unspezifische Präzipitate von Serumproteinen;
Erklärung zu den Abkürzungen 3V/76, N11, 2BH₂S₁, X100, HA, Se, P, +, -, d, → siehe Legende zu Abb. 4.23. S.70

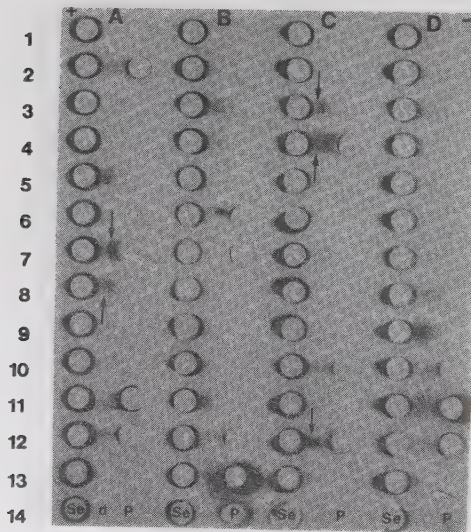


Abb. 4.25. Gegenstromelektrophoresen von Immunglobulinfraktionen aus Patientenseren gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

A		B		C		D	
Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe
1: 7Ig	7N1S	7Ig	7N5S	9Ig	9N1S	9Ig	9N5S
2: 7Ig	7T1S	7Ig	7T5S	9Ig	9T1S	9Ig	9T5S
3: 7Ig	7N2S	7Ig	7N5X	9Ig	9N1X	9Ig	9N5X
4: 7Ig	7T2S	7Ig	7T5X	<u>9Ig</u>	<u>9T1X</u>	9Ig	9T5X
5: 7Ig	7N1X	7Ig	7N6S	9Ig	9N2S	9Ig	9NOS
6: 7Ig	7T1X	7Ig	7N6X	9Ig	9T2S	9Ig	9TOS
7: <u>7Ig</u>	<u>7N2X</u>	7Ig	7NOS	9Ig	9N2X	9Ig	9N2S
8: <u>7Ig</u>	<u>7T2X</u>	7Ig	7TOS	9Ig	9T2X	9Ig	9T7S
9: 7Ig	7N3S	7Ig	7N7S	9Ig	9T3S	9Ig	HA
10: 7Ig	7T3S	7Ig	7T7S	9Ig	9T3X	9Ig	3V/76
11: 7Ig	7N3X	7Ig	HA	9Ig	9T6S	9Ig	2BH ₂ S ₁
12: 7Ig	7T3X	7Ig	3V/76	<u>9Ig</u>	<u>9T6X</u>	9Ig	N11 ² ₁
13: 7Ig	PBS	7Ig	2BH ₂ S ₁	9Ig	PBS	9Ig	PBS
14: 7Ig	X100	7Ig	N11	9Ig	x100	9Ig	PBS

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen, 7Ig u. 9Ig sind 1:4 mit PBS verdünnt;

Erklärung zu den Abkürzungen 3V/76, N11, 2BH₂S₁, X100, HA, Se, P, +, -, d, → siehe Legende zu Abb. 4.23. S. 70

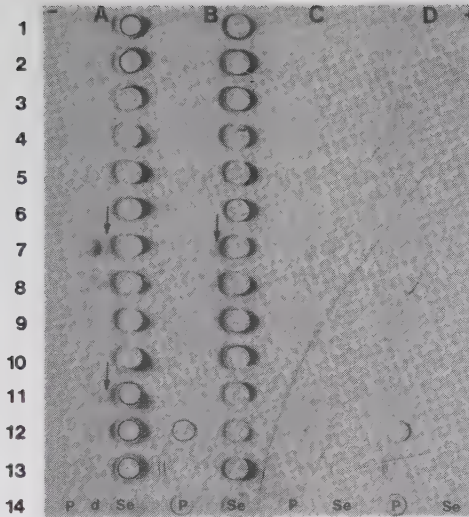


Abb. 4.26. Gegenstromelektrophorese der Immunglobulinfraktion eines Patientenserums und des Serums eines gesunden Probanden gegen Proteinproben eines Nierenkarzinoms

A		B		C		D	
Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum
1: 4N1X	10Ig	4N5S	10Ig	4N1S	05Se	4N5S	05Se
2: 4T1X	10Ig	4T5S	10Ig	4T1S	05Se	4T5S	05Se
3: 4N1S	10Ig	4N5X	10Ig	4N1X	05Se	4N5X	05Se
4: 4T1S	10Ig	4T5X	10Ig	4T1X	05Se	4T5X	05Se
5: 4N2S	10Ig	4N6S	10Ig	4N2S	05Se	4N6S	05Se
6: 4T2S	10Ig	4T6S	10Ig	4T2S	05Se	4T6S	05Se
7: 4N2X	10Ig	4N6X	10Ig	4N2X	05Se	4N6X	05Se
8: 4T2X	10Ig	4T6X	10Ig	4T2X	05Se	4T6X	05Se
9: 4N3S	10Ig	4N7S	10Ig	4N3S	05Se	4N7S	05Se
10: 4T3S	10Ig	4T7S	10Ig	4T3S	05Se	4T7S	05Se
11: 4N3X	10Ig	HA	10Ig	4N3X	05Se	HA	05Se
12: 4T3X	10Ig	3V/76	10Ig	4T3X	05Se	3V/76	05Se
13: PBS	10Ig	2BH ₂ S ₁	10Ig	PBS	05Se	2BH ₂ S ₁	05Se
14: X100	10Ig	N11 ² ₁	10Ig	X100	05Se	N11 ² ₁	05Se

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen;

Erklärung zu den Abkürzungen 3V/76, N11, 2BH₂S₁, X100, HA, Se, P, +, -, d, → siehe Legende zu Abb. 4.23. S. 70

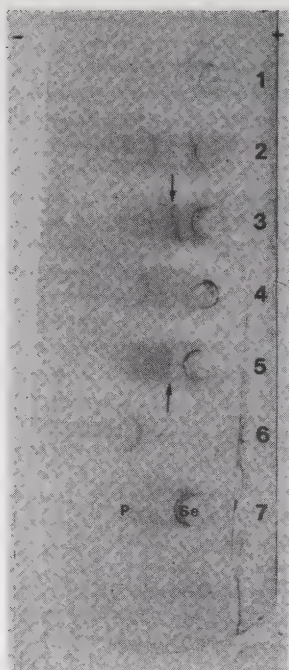


Abb. 4.27. Mikrogegenstrom-elektrophorese von Patientenserum gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

Probe	Serum
1: 7N1X	7Se
2: 7T1X	7Se
3: 9N1X	9Se
4: 9T1X	9Se
5: 4N1X	4Ig
6: 4T1X	4Ig
7: 4T2X	4Ig

Se : Serumauftragestelle
P : Probenauftragestelle
+ : Anodenseite
- : Kathodenseite
d : 4 mm

→: Präzipitationslinie
je 20 ul Serum bzw. Probe
wurden in ein Schablonen-
loch pipettiert (vgl.
3.6.4.)

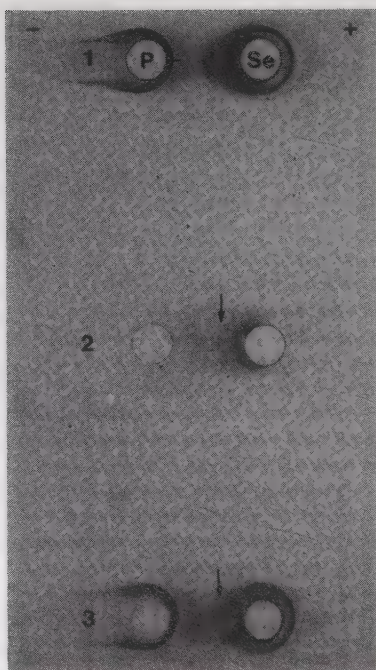


Abb. 4.28. Gegenstromelektrophorese von Patientenserum gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen und anschließende 2. Gegenstrom-elektrophorese mit antihuman IgG Antikörpern vom Schaf in den Auf-tragstellungen für Probe und Serum von 1 u. 3 (vgl. 3.6.5.)

Probe	Serum
1: 7N1X	7Se
2: 9N1X	9Se
3: 9N1X	9Se

→: Präzipitationslinie von
9N1X gegen 9Se

+ : Anodenseite
- : Kathodenseite

Se : Serumauftragestelle
P : Probenauftragestelle
d : 4 mm

4.4. Elektrophoretische Untersuchung von Immunpräzipitaten

Zur näheren Charakterisierung der an den Präzipitaten beteiligten Antigene wurden zwei verschiedene Wege eingeschlagen:

1. die Auftrennung von Proteinproben in SDS PAGE oder IFPAG und anschließende Immunelektrophorese;
2. die immunologische Untersuchung von Proteinproben in der Gegenstromelektrophorese und anschließende elektrophoretische Auftrennung von Präzipitaten in der SDS PAGE.

4.4.1. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinproben und anschließende Immunelektrophorese

4.4.1.1. SDS PAGE und Immunelektrophorese (vgl. 3.7.):

In Vorversuchen wurde Humanserum in der SDS PAGE aufgetrennt. In der Immunelektrophorese gegen Antihumanserum bildeten sich zahlreiche Präzipitationslinien aus. Störende Einflüsse des SDS machten sich bemerkbar, wenn der Lubrolstreifen zu schmal war. Wurden Proteinproben aus Nierenkarzinomen in der SDS PAGE aufgetrennt und anschließend gegen Patientenserum getestet, so waren kaum Präzipitate sichtbar (Abb. 4.29.). Bei Wiederholung der Versuche konnten sie nicht mehr nachgewiesen werden.

4.4.1.2. IFPAG und Immunelektrophorese (vgl. 3.8.):

Die Proben 9N1S und 9T1S wurden gegen verschiedene Seren und Immunglobulinfraktionen getestet (Tab. 4.5.). Es fiel eine halbkreisförmige bis ovale Präzipitationslinie im Agarosegel auf, die dem pH-Bereich 3,5 - 4 der IEF-Gele gegenüberlag (Abb. 4.31.). Sie

befand sich jedoch auf der der Kathode zugewandten Hälfte des Agarosegels. Die Präzipitate waren nicht sichtbar, wenn IEF-Gele ohne Proteinproben oder Agarosegele ohne Serum für die Immunelektrophorese benutzt wurden. Sie traten auch nicht bei allen getesteten Seren auf (Tab. 4.5.). Ob es sich um spezifische Immunpräzipitate handelte, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

	9N1S	9T1S	leeres IEF Gel
leeres Agarosegel	-	-	-
7Ig	+	+	0
9Ig	+	+	-
10Ig	+	+	0
03Se	+	+	0
06Se	+	+	0
07Se	0	-	0

Tab. 4.5. Übersicht über die Ergebnisse von Immunelektrophoresen mit Gelen aus dem IFPAG

+ : Präzipitat sichtbar
 - : kein Präzipitat sichtbar
 0 : Paarung nicht getestet



Abb. 4.29. Immunelektrophorese; 9T1S gegen 9Ig, 9T1S vorher in SDS PAGE aufgetrennt

A: SDS PAGE-Gelstreifen (nach der Immunelektrophorese entfernt)

16%: 16% Bereich des PAA Gradientengels (vgl. Abb. 3.b.)

7,5%: 7,5% Bereich des PAA Gradientengels (vgl. Abb. 3.b.)

B: lubrolenthaltendes Agarosegel

C: 2% (v/v) Serum enthaltendes Agarosegel

+: Anodenseite bei der Immunelektrophorese

-: Kathodenseite bei der Immunelektrophorese

►: Präzipitationslinie



Abb. 4.30. Immunelektrophorese; 9T1S gegen 7Ig, 9T1S vorher in SDS PAGE aufgetrennt

Erläuterungen zu A, 16%, 7,5%, B, C, +, -, ► s. Abb. 4.29.

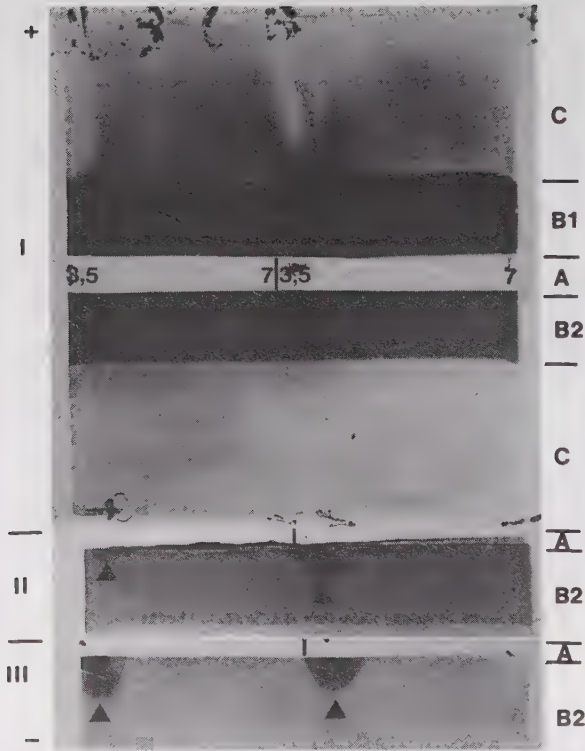


Abb. 4.31. Immunelektrophorese; Immunglobulinfraktionen aus Patienten-
seren gegen Proteinproben aus einem Nierentumor, Protein-
proben vorher in IFPAG aufgetrennt

- I: vollständig abgebildetes Agarosegel der Immunelektrophorese von
9N1S gegen 9Ig und 9T1S gegen 9Ig
 - II: Abschnitt A und B2 der Immunelektrophorese von 9N1S-7Ig u. 9T1S-7Ig
 - III: Abschnitt A und B2 der Immunelektrophorese von 9N1S-10Ig u. 9T1S-10Ig
 - A: IEF-Gele (nach der Elektrophorese entfernt)
 - B1: Immunglobuline enthaltender Gelstreifen auf der Anodenseite von A
 - B2: Immunglobuline enthaltender Gelstreifen auf der Kathodenseite von A
 - C: Agarosegel ohne Immunglobuline
 - +: Anodenseite der Immunelektrophorese
 - : Kathodenseite der Immunelektrophorese.
 - 3,5; 7: pH 3,5 bzw. pH 7 Bereich der IEF-Gele
 - ▲ : Präzipitate (sie liegen auf der Kathodenseite der IEF-Gele)
- für eine Immunelektrophorese wurden aus 2 IEF-Gele die Bereiche
zwischen pH 3,5 u. pH 7 herausgeschnitten und bei A zwischen die
beiden Agarosehälften gelegt (vgl. 3.8.)

4.4.2. Auftrennung von Präzipitaten aus der Gegenstromelektrophorese in der SDS PAGE

Es wurde versucht, Präzipitate aus der Gegenstromelektrophorese in der SDS PAGE aufzutrennen. Dabei war die Kombination der Proben 9N1X und 9T1X mit verschiedenen Seren am geeignetsten. Es stand genügend Material zur Verfügung, um möglichst viele Seren zu testen. Die Präzipitate ließen sich gut reproduzieren. Die Proben reagierten mit fast allen Immunglobulinfraktionen und Seren von Nierenkarzinompatienten aber nur mit wenigen von tumorfreien Probanden.

Tab. 4.6. und Abb. 4.33. zeigen die Ergebnisse der Gegenstromelektrophorese. Der Abstand zwischen den Auftragestellen betrug immer 4 mm. Für die Übersichtselektrophorese (Abb. 4.33.) wurden Volumina von 10 ul aufgetragen, zur Gewinnung der Präzipitate für die SDS PAGE 45 ul Proteinprobe bzw. 45 ul Serum pro Auftragestelle; der pH betrug 8,1 (vgl. 3.9.1.). Alle Agarosegele wurden 6 - 7 Tage unter Schütteln in PBS + 0,5% Triton-X-100 gewaschen. Dabei konnte eine von der Probe 9N1X stammende, unscharf begrenzte Bande fast völlig herausgewaschen, eine halbmondförmige, kathodwärts von der Serumauftragestelle liegende, unspezifische Bande jedoch nicht entfernt werden (Abb. 4.32.). Das Immunpräzipitat befand sich in einer schmalen Zone dazwischen.

Wie im Methodenteil beschrieben (3.9.2.) wurde das Gel zwischen den beiden Auftragestellen in drei Streifen geteilt (Abb. 4.34.):

1. Der erste Streifen bestand aus dem Gelstückchen, das sich zwischen dem Immunpräzipitat und der Probenauftragestelle befand.
2. Im zweiten Streifen lag das Immunpräzipitat.
3. Im dritten Streifen lag das unspezifische Präzipitat nahe der Serumauftragestelle.

Es wurden immer die entsprechenden Gelstückchen von 3 - 6 Lochpaaren zu einer Probe zusammengefaßt (Abb. 4.34.).

In der SDS PAGE stellte sich heraus, daß trotz 7tägigen Differenzierens sowohl unspezifische Proteine aus 9N1X als auch aus den Seren über die ganze Strecke zwischen den Auftragestellen verteilt noch vorhanden waren. Sowohl in der Kombination 9N1X/PBS als auch in PBS/Serum traten nämlich in allen drei Agarosegelabschnitten in der SDS PAGE Banden auf (Abb. 4.35.). Dies war auch der Fall, wenn Gelstückchen aus Kombinationen von 9N1X mit Seren in denen kein Immunpräzipitat nachweisbar war, aufgetrennt wurden (Abb. 4.38.). Die von 9N1X im Agarosegel übriggebliebenen Proteine bildeten im Vergleich zur vollständigen Probe (Abb. 4.36.) nur noch wenige Banden. Ihr Bandenmuster war in allen drei Agarosegelabschnitten gleich. Die Banden lagen im selben Bereich wie Banden von Serumproteinen. Der ganze Komplex wanderte im Molekulargewichtsbereich von etwa 60.000 Dalton. Serumproteine aus dem dritten Teil des Agarosegels wurden in zusätzlich 3 - 4 Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 60.000 und 20.000 Dalton aufgetrennt (Abb. 4.35.).

Die Ergebnisse der SDS PAGE verschiedener 9N1X - Serum-Paarungen geben Abb. 4.35. bis Abb. 4.38. wieder. In Gelstückchen, die Immunpräzipitate enthielten, fanden sich nur Proteine, die im gleichen Bereich wie Proteine aus den Gelstreifen rechts und links von ihnen Banden bildeten, bzw. wie Proteine aus dem mittleren Agarosegelstreifen bei Paarungen 9N1X/PBS und PBS/Serum.

Zwischen Seren, die in der Gegenstromelektrophorese Präzipitate bildeten, und Seren mit negativer Reaktion bestand kein Unterschied (Abb. 4.38.). Es konnten also keine den Präzipitaten eindeutig zuzuordnenden Proteine gefunden werden. Sie hätten Banden bilden müssen, die sich klar von denen unspezifischer Proteine im Agarosegel unterscheiden.

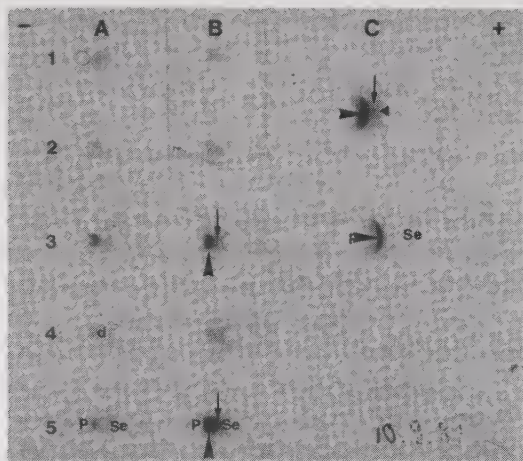


Abb. 4.32. Gegenstromelektrophorese von Patientenserum gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen

A		B		C	
Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum
1: 7N1X	7Se	7N1X	9Se	<u>9N1X</u>	<u>9Se</u>
2: 7T1X	7Se	7T1X	9Se	<u>9N1X</u>	PBS
3: 7N2X	7Se	<u>9N1X</u>	<u>9Se</u>		
4: 7T2X	7Se	<u>9N2X</u>	<u>9Se</u>		
5: 7T3X	7Se	<u>9T6X</u>	<u>9Se</u>		

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen; bei A u. B wurden je 7 μ l Probe und Serum aufgetragen, bei C 50 μ l; das Gel wurde 3 Tage in PBS + 0,5% Triton-X-100 differenziert;

- : Immunpräzipitat
- ▶ : Präzipitat von Proteinen aus 9N1X
- : unspezifisches Präzipitat von Serumproteinen
- P : Probenauftragestelle Se : Serumauftragestelle
- : Kathodenseite + : Anodenseite
- d : 4 mm

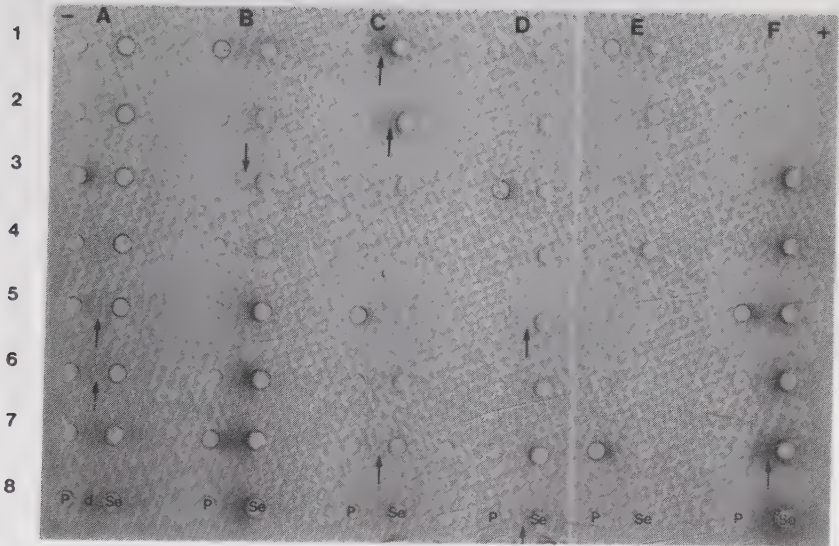


Abb. 4.33. Gegenstromelektrophorese, Austestung von Seren gegen Proteinproben aus Nierenkarzinomen, Übersicht für die anschließende Auftrennung von Immunpräzipitaten in SDS PAGE

A		B		C		D		E		F	
Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum	Probe	Serum
1: 4N1X	03Se	7N1X	7Se	<u>9N1X</u>	<u>9Se</u>	4N1X	8Se	7N1X	08Se	9N1X	PBS
2: 4T1X	03Se	7T1X	7Se	<u>9T1X</u>	<u>9Se</u>	4T1X	8Se	7T1X	08Se	9T1X	PBS
3: 7N1X	03Se	<u>9N1X</u>	<u>7Se</u>	4N1X	10Se	7N1X	8Se	9N1X	08Se	4N1X	4Se
4: 7T1X	03Se	<u>9T1X</u>	<u>7Se</u>	4T1X	10Se	7T1X	8Se	9T1X	08Se	4T1X	4Se
5: 9N1X	03Se	4N1X	9Se	7N1X	10Se	<u>9N1X</u>	<u>8Se</u>	4N1X	PBS	7N1X	4Se
6: <u>9T1X</u>	<u>03Se</u>	4T1X	9Se	7T1X	10Se	<u>9T1X</u>	<u>8Se</u>	4T1X	PBS	7T1X	4Se
7: 4N1X	7Se	7N1X	9Se	9N1X	10Se	4N1X	08Se	7N1X	PBS	<u>9N1X</u>	<u>4Se</u>
8: 4T1X	7Se	7T1X	9Se	9T1X	10Se	<u>4T1X</u>	<u>08Se</u>	7T1X	PBS	<u>9T1X</u>	<u>4Se</u>

präzipitatbildende Paare sind unterstrichen;

→: Präzipitationslinie

d : 4 mm

P : Probenaufragestelle

Se : Serumauftragestelle

- : Kathodenseite

+ : Anodenseite

10 ul Serum bzw. Probe pro Auftragestelle;

Gele eine Woche in PBS + 0,5% Triton-X-100 differenziert

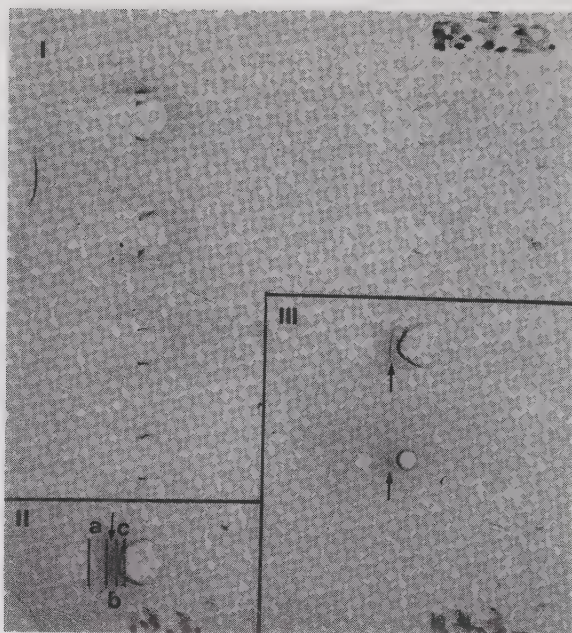


Abb. 4.34. Beispiel für eine Gegenstromelektrophorese zur Gewinnung von Immunpräzipitaten für die Auftrennung in der SDS PAGE

A		B	
Probe	Serum	Probe	Serum
1: 9N1X 45 ul	03Se 45 ul	9N1X 45 ul	03Se 45 ul
2: 9N1X 45 ul	03Se 45 ul	9N1X 45 ul	03Se 45 ul
3: 9N1X 45 ul	03Se 45 ul	9N1X 45 ul	03Se 45 ul
4: 9N1X 45 ul	03Se 45 ul	9N1X 7 ul	03Se 7 ul
5: 9N1X 45 ul	03Se 45 ul		

→: Immunpräzipitat
P: Probenauftragestelle
-: Kathodenseite

d: 4 mm
Se: Serumaufragestelle
+: Anodenseite

a: Gelstreifen zwischen Immunpräzipitat und Probenauftragestelle
b: Gelstreifen mit Immunpräzipitat
c: Gelstreifen mit unspezifischem Präzipitat von Serumproteinen

Die Präzipitate waren ohne Anfärbung nicht sichtbar. Das Gel wurde 7 Tage in PBS + 0,5% Triton-X-100 differenziert. Gelteile II u. III wurden anschließend ausgeschnitten, angefärbt und dann wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht. Anschließend wurden in Teil I Gelstreifen den Bereichen a, b und c entsprechend herausgeschnitten und für die SDS PAGE weiter aufbereitet. Erst dann wurde auch Teil I angefärbt.

Erläuterung der Bezeichnung für die in der SDS PAGE aufgetrennten Proteinproben in den Abb. 4.35. - 4.38. s. S. 86-89

Die Bezeichnung besteht aus 2 Teilen: Der erste Teil gibt an, von welchem Proben-Serum-Paar der Gegenstromelektrophorese die Proteinprobe stammt, der zweite Teil gibt an, aus welchem der 3 Streifen zwischen den beiden Auftragslöchern (vgl. Abb. 3.34.).

b- bedeutet, der Streifen enthält kein Immunpräzipitat, b+, im Streifen befindet sich ein Immunpräzipitat.

Beispiel:

9N1X/PBS b-

bezeichnet die Proteinprobe aus Agarosegelstreifen von Gegenstromelektrophoresen in denen 9N1X gegen PBS (statt eines Serums) wanderte. Es sind die mit b bezeichneten Streifen (vgl. Abb. 4.34.) die in diesem Fall kein Immunpräzipitat enthalten.

Legende zu Abb. 4.35. S.86 SDS PAGE-Gele (Gradient s. Abb. 3.3.b.): aufgetrennte Proteine aus Agarosegelen von Gegenstromelektrophoresen

a: Cyt C + BSA	b: PBS/03Se a	e: 9N1X/03Se a	h: 9N1X/PBS a
	c: PBS/03Se b-	f: 9N1X/03Se b+	i: 9N1X/PBS b-
	d: PBS/03Se c	g: 9N1X/03Se c	j: 9N1X/PBS c
k: PBS/9Se a	n: 9N1X/9Se a	q: PBS/9N1Xb	
l: PBS/9Se b-	o: 9N1X/9Se b+	r: Cyt C + BSA	
m: PBS/9Se c	p: 9N1X/9Se c		

- : Rinder-Serum-Albumin (BSA) MW 64.000 Dalton
- ▶: Cytochrom C (Cyt C) MW 12.000 Dalton
- ▷: Cytochrom C-Dimer MW 24.000 Dalton

Proteine aus 3 Proben-Serum-Paaren der Gegenstromelektrophorese wurden pro Gelröhrchen aufgetragen. Die Auftrennungen Immunpräzipitat enthaltender (f, o) und kein Immunpräzipitat enthaltender Proben (c, i, l) unterscheiden sich nicht.

Erläuterung der Proteinprobenbezeichnungen siehe oben.

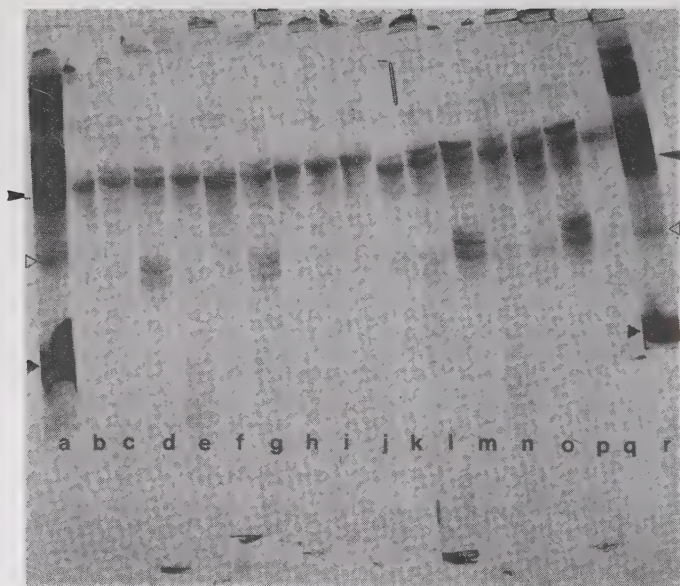


Abb. 4.35. Legende s. S.85

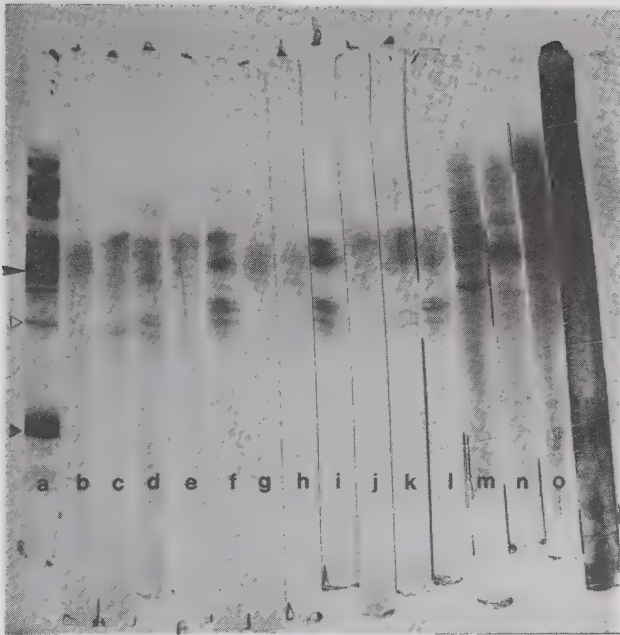


Abb. 4.36. SDS PAGE-Gele (Gradient s. Abb. 3.3.b.): aufgetrennte Proteine aus Agarosegelen von Gegenstromelektrophoresen

a: Cyt C + BSA b: 9N1X/9Se a e: 9N1X/4Se b+ g: 9N1X/10Se a
c: 9N1X/9Se b+ f: 9N1X/4Se c h: 9N1X/10Se b+
d: 9N1X/9Se c i: 9N1X/10Se c

j: 9N1X/08Se a m: 9N1X
k: 9N1X/08Se b- n: 9T1X
l: 9N1X/08Se c o: 4N1X

Erläuterung der Proteinprobenbezeichnung s. S.85

►: Rinder-Serum-Albumin (BSA) MW 64.000 Dalton
▶: Cytochrom C (Cyt C) MW 12.000 Dalton
▷: Cytochrom C-Dimer MW 24.000 Dalton
m, n, o: lyophilisierte und in Probenpuffer aufgelöste Proben

Proteine aus 3 Proben-Seren-Paaren der Gegenstromelektrophorese wurden pro Gelröhrchen aufgetragen.



Abb. 4.37. SDS PAGE-Gele (Gradient s. Abb. 3.3.b.): aufgetrennte Proteine aus Agarosegelen von Gegenstromelektrophoresen

a: 9N1X/15Se a	d: 9N1X/10Se a	g: 9N1X/03Se a	j: 9N1X/06Se a
b: 9N1X/15Se b+	e: 9N1X/10Se b+	h: 9N1X/03Se b+	k: 9N1X/06Se b-
c: 9N1X/15Se c	f: 9N1X/10Se c	i: 9N1X/03Se c	l: 9N1X/06Se c
m: 9N1X/7Se a	p: Agarosepulver I		
n: 9N1X/7Se b+	q: Agarosepulver II		
o: 9N1X/7Se c	r: Cyt C + BSA		

Erläuterung der Probenbezeichnung s. S.85

►: Rinder-Serum-Albumin (BSA) MW 65.000 Dalton

►: Cytochrom C (Cyt C) MW 12.000 Dalton

p, q: 2 verschiedene Agarosepulver wurden in Probenpuffer aufgelöst und aufgetragen

Proteine aus 6 Proben-Serum-Paaren der Gegenstromelektrophorese wurden pro Gelröhrchen aufgetragen.

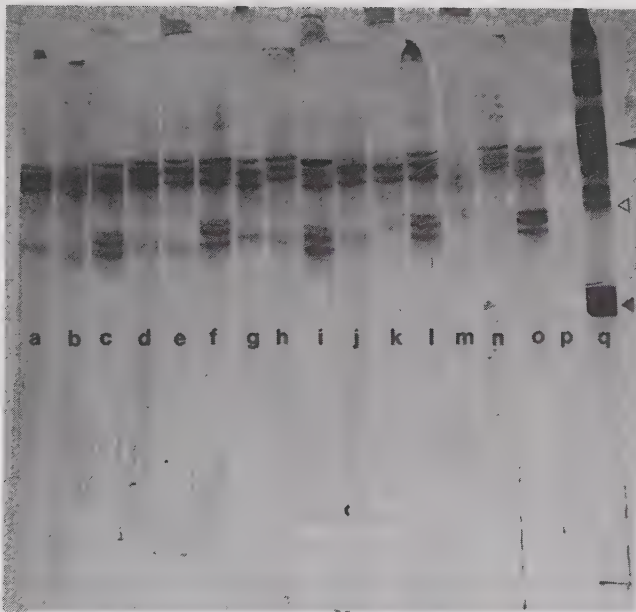


Abb. 4.38. SDS PAGE-Gele (Gradient s. Abb. 3.3.b.): aufgetrennte Proteine aus Agarosegelen von Gegenstromelektrophoresen

a: 9N1X/08Se a d: 9N1X/7Se a g: 9N1X/4Se a j: 9N1X/8Se a
b: 9N1X/08Se b- e: 9N1X/7Se b+ h: 9N1X/4Se b+ k: 9N1X/8Se b+
c: 9N1X/08Se c f: 9N1X/7Se c i: 9N1X/4Se c l: 9N1X/8Se c
m: 9N1X/05Se a p: keine Probe aufgetragen
n: 9N1X/05Se b- q: Cyt C + BSA
o: 9N1X/05Se c

Erläuterung der Probenbezeichnungen s. S.85

- : Rinder-Serum-Albumin (BSA) MW 64.000 Dalton
- ▶: Cytochrom C (Cyt C) MW 12.000 Dalton
- ▷: Cytochrom C-Dimer MW 24.000 Dalton

Proteine aus 6 Proben-Serum-Paaren der Gegenstromelektrophoreses wurden pro Gelröhrchen aufgetragen.

5. DISKUSSION

Um Material für immunologische und biochemische Untersuchungen am Nierenkarzinom zu gewinnen, werden in einem großen Teil der bisher veröffentlichten Arbeiten Zelllinien aus Tumoren herangezogen. Dabei dienen kleine Gewebstückchen als Ausgangsmaterial für die Primärkultur (Daly e. a. 1974) oder sie werden vorher mit Trypsin (Hakala e. a. 1974, Cummings e. a. 1973), Trypsin und Kollagenase (Ueda e. a. 1979) oder Hyaluronidase, Kollagenase und Desoxyribonuklease (Nakano e. a. 1984) behandelt. Bei letzteren Verfahren werden einzelne Zellen aus dem Gewebsverband herausgelöst. Sie werden durch Filtrieren oder Zentrifugieren in einem Ficoll^R-Gradienten (Ghose e. a. 1979, Hemstreet e. a. 1980) von Gewebsresten isoliert und danach in geeigneten Medien gezüchtet.

Nierenkarzinomzellen wachsen so über viele Generationen in Zellkultur. Zellen vom normalen Nierenparenchymgewebe stellen nach 5 - 6 Passagen ihr Wachstum ein, so daß nur sehr geringe Mengen an Normalzellen in vitro gezüchtet werden können.

Die Verwendung von Zellkulturen bietet manche Vorteile.

Immunologische Untersuchungsmethoden wie der Zytotoxizitätstest oder immune adherence assay (Irie e.a. 1975) benötigen intakte Target-Zellen.

Moleküle lassen sich aus der Zelloberfläche mit Proteasen lösen, ohne daß eine Kontamination mit anderen Zellkomponenten eintritt.

Moleküle können metabolisch radioaktiv markiert werden.

Die Tumorzellen stehen unbegrenzte Zeit für Untersuchungen zur Verfügung.

Speziell beim Nierenkarzinom können störende Einflüsse von an Tumorzellen adsorbierten Immunglobulinen durch Kultivieren umgangen werden.

Nachteilig erweist sich, daß durch Behandlung mit Enzymen und das Wachsen in Kultur Veränderungen im Antigenmuster der Zellen eintreten können (Cikes 1971). Beim Nierenkarzinom fehlen Untersuchungen über solche Veränderungen.

Dieses Problem stellt sich in der vorliegenden Arbeit nicht, da Nierenkarzinom und Normalnierengewebe direkt als Ausgangsmaterial für die weitere Aufarbeitung herangezogen worden sind.

In einem ersten Schritt sind für die vergleichende Untersuchung subzelluläre Fraktionen durch differentielles Zentrifugieren hergestellt worden. Der Nachweis, daß in verschiedenen Sedimenten bestimmte Zellstrukturen angereichert sind, wird nicht erbracht. Jedoch besteht auf Grund der Arbeiten Scherberichs (Mondorf e. a. 1972, Scherberich e. a. 1974), von dem das Verfahren teilweise übernommen worden ist, die Annahme, daß in der Fraktion S5 Plasmamembranen angereichert sind. Er zeigt dies an normalem Nierengewebe, wo in dem Sediment die Konzentration der Leitenzyme für Plasmamembranen wie γ -Glutamyltranspeptidase zunehmen, die Leitenzyme für andere Organellen dagegen abnehmen. In den Sedimenten S1 und S2 dürften Zellkerne und Zelltrümmer, in S3 Mitochondrien und in S6 Mikrosomen angereichert sein (Rowin 1974).

Zur elektrophoretischen Untersuchung der Proteine aus den subzellulären Fraktionen der Nierenkarzinome und für die in der vorliegenden Arbeit angewandten immunologischen Methoden - Immundoppeldiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese - müssen die Moleküle zuerst in Lösung gebracht werden.

Die Lösungsmittel sollten folgende Forderungen erfüllen. Sie sollen einen möglichst großen Anteil an Membranmolekülen lösen, ihre Antigenität nicht verändern und Immundoppeldiffusion, Gegenstromelektrophorese, Immunelektrophorese, SDS PAGE und IFPAG nicht stören.

Durch Lösung mit Ultraschall in PBS werden zwar Extrakte gewonnen, deren elektrophoretische Auftrennung

und immunologische Austestung keine Schwierigkeiten bereitet. Es bleibt jedoch ein Großteil an Molekülen unberücksichtigt die dabei nicht in Lösung gehen. Durch Behandlung mit nichtionischen Detergenzien wie Triton-X-100 oder Nonidet-P-40 können weitere Moleküle solubilisiert werden, ohne daß sich ihre Antigenität wesentlich verändert (Crumpton u. Parkhouse 1972). Die so aus den subzellulären Fraktionen extrahierten Proteine bestimmten Zellbestandteilen zuzuordnen ist jedoch nicht möglich. Hierzu wäre eine weitere Anreicherung und Reinigung der verschiedenen subzellulären Strukturen durch Dichtegradientenzentrifugation notwendig. Komponenten der äußeren Zellmembran, die vor allem für immunologische Untersuchungen von Bedeutung sind, ließen sich relativ einfach gewinnen, in dem man sie aus in vitro kultivierten Zellen mit nichtionischen Detergenzien löst (Ogata e. a. 1981). Beide Vorgehensweisen würden jedoch zu wenig Material für die in der vorliegenden Arbeit angewandten Tests erbringen.

Durch differentielles Zentrifugieren und lösen der Proteine mit 2 verschiedenen Verfahren, nämlich Ultraschall- und Triton-X-100-Behandlung, wird das Nierenkarzinomgewebe in viele Kompartimente unterteilt. Um sie untereinander zu vergleichen, werden die in ihnen gelösten Proteine an Hand der Parameter Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt näher charakterisiert.

Die elektrophoretische Auftrennung gemäß ihrem Molekulargewicht erfolgt in der SDS PAGE (Weber u. Osborn 1969, Shapiro e. a. 1967). Die bessere Auftrennung in Gelen mit kontinuierlichem Gradienten ist von vielen Autoren bestätigt worden (Slater 1968, Margolis 1969). Sie beruht darauf, daß die Porengröße im Gel kontinuierlich abnimmt. Die Proteinmoleküle wandern so lange, bis sie den Gelbereich erreichen, in dem die zu kleinen Poren ein Weiterkommen verhindern. An dieser

Stelle im Gel sammeln sie sich an. Eine zusätzliche Optimierung der Bandenschärfe kann durch die von Davis und Ornstein entwickelte diskontinuierliche Elektrophorese erreicht werden (Davis 1964, Ornstein 1964). Sie kommt meist in der von Laemmli beschriebenen Modifikation in Verbindung mit SDS zur Anwendung (Laemmli 1970).

Die Auftrennung der Proteinmoleküle gemäß dem isoelektrischen Punkt erfolgt in der IFPAG (Vesterberg 1972). Zur Vermeidung von Bandenverzerrungen ist eine möglichst geringe Ionenkonzentration in der Probenlösung nötig. Andererseits kann kein Lösungsvermittler wie das ionische Detergens SDS verwendet werden. Deshalb mußten die Proben in einem großen Volumen aufgelöst werden, um ein Ausfällen von Proteinen zu vermeiden. Harnstoff wäre als Lösungsvermittler geeignet. Die im IEF aufgetrennten Proteine sollten aber mit immunologischen Methoden anschließend weiter untersucht werden können. Harnstoff stört jedoch bei immunologischen Untersuchungen. Versuche in horizontalen Flachgelen, die meist für IFPAG verwendet werden, haben keine erfolgreiche Auftrennung gezeigt, auch wenn größere Probenvolumina appliziert worden sind. Deswegen wird auf IEF in Rundgelen zurückgegriffen und die Proben vor der Polymerisation auf das Volumen der Gellösung von je einem Röhrchen verteilt. Die Nachteile einer schlechteren Vergleichbarkeit und einer größeren Menge Anoden- und Kathodenlösung werden dabei in Kauf genommen.

Mit SDS PAGE und IFPAG die Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte von Proteinen zu untersuchen, erscheint beim Nierenkarzinom sinnvoll, weil meist gesundes Vergleichsgewebe vom selben Organ und selben Patienten zur Verfügung steht. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Niere eine große histologische Vielfalt aufweist. Genaugenommen lassen sich nur Tumorzellen und Normalzellen vom gleichen histologischen Typ, aus dem der Tumor entstanden ist, vergleichen. Allgemein wird angenommen, daß sich Nie-

renkarzinome aus Zellen des proximalen Tubulus entwickeln, da elektronenmikroskopische Untersuchungen eine Ähnlichkeit zwischen Nierenkarzinomzellen und Epithelzellen des proximalen Tubulus gezeigt haben (Oberling e. a. 1960). In der vorliegenden Arbeit werden aber Proteinproben aus der gesamten Niere gewonnen. In Proteinproben aus Fraktionen des Tumoraanteils auftretende zusätzliche Banden könnten Tumorassoziierte Banden vortäuschen, weil der Anteil der Proteine gesunder Nierenzellen, aus denen der Tumor entstanden ist, in Proben aus dem Gewebe des gesamten Normalnierenanteils zu gering ist. Für Tubuluszellen spezifische Proteine bilden bei der Auftrennung von Proben aus Normalgewebe in diesem Fall keine sichtbaren Banden. Bei der Auftrennung von Proben aus Tumorgewebe würden aber Banden mit tubuluszellspezifischen Proteinen erscheinen, da sie im Karzinom geklont wären, nimmt man ihre Entstehung aus einer Zelle an. Andererseits kann die größere Anzahl von Banden bei Normalgewebeproben als bei Proben aus dem Tumor mit der Heterogenität des Normalnierenanteils erklärt werden.

Ein weiteres Problem stellt die Änderung des Bandenmusters in Relation zur Zeit dar. Zeitlich auseinanderliegende Elektrophoresen zeigen Unterschiede im Bandenmuster. Offensichtlich ändern biologisch aktive Substanzen wie Enzyme trotz des Arbeitens bei niedriger Temperatur und wiederholtes Einfrieren und Auftauen die Zusammensetzung der Proteingemische hinsichtlich des Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes. Trotzdem sind sich Proben aus den gleichen Fraktionen verschiedener Nieren sehr ähnlich, wenn sie unter gleichen Bedingungen aufbewahrt werden und in einer Elektrophorese aufgetrennt werden.

In der Literatur findet sich nur eine Arbeit, in der ähnlich wie hier über vergleichende Untersuchungen von Nierentumorzellen und Epithelzellen von

normalem Nierengewebe berichtet wird (Ogata e. a. 1981). Ausgangsmaterial bilden in dieser Studie in Kultur gezüchtete Zellen. Aus ihnen werden ^3H -Glucosamin-markierte Glykoproteine mit Nonidet-P-40 gelöst und in der von O'Farrell beschriebenen zweidimensionalen Elektrophorese (1. Dimension IFPAG, 2. Dimension SDS PAGE) aufgetrennt (O'Farrell 1975). Dort findet sich ebenfalls eine große Ähnlichkeit zwischen Tumor- und Normalnierzellen und die Auftrennung von Proteinproben aus Normalnierzellen in mehr Komponenten.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit treten jedoch auch Proteine auf, die nur in Nierentumorzelllinien vorhanden sind. Dabei bleibt offen, ob es sich nicht doch nur um quantitative Unterschiede handelt (bei Normalzellen könnte die Konzentration unter oder nahe bei der Nachweisgrenze liegen). Neben dem besseren Auflösungsvermögen der zweidimensionalen Methode in Verbindung mit radioaktiver Markierung der Proteine könnten auch kulturbedingte Einflüsse (Normalnierzellen sind nur über wenige Generationen in Kultur gewachsen) Unterschiede hervorrufen (Hakala e. a. 1974).

Fehlende Unterschiede im Bandenmuster zwischen Tumor- und Normalanteil können darauf beruhen, daß sich tumorassoziierte Proteine in ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht nicht von Proteinen aus gesundem Nierengewebe unterscheiden.

Wegen der geringen nicht regelmäßig auftretenden Unterschiede zwischen Tumor- und Normalanteil bleibt die Aussagekraft von SDS PAGE und IFPAG allein beschränkt. Es müssen deshalb weitere biologische Eigenschaften, z.B. Enzymaktivität oder Rezeptorfunktion für Hormone (Hemstreet e. a. 1980, Mukamel e. a. 1984) gefunden werden, um eine Differenzierung zu ermöglichen.

In vielen Untersuchungen werden immunologische Eigenschaften tumorassoziiierter Proteine, in diesem Zusammenhang tumorassoziiierter Antigene, als Unterscheidungsmerkmale benutzt. Ihre immunologischen Eigen-

schaften können nur im Zusammenhang mit gegen sie gerichteten Antikörpern oder immunkompetenten Zellen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit dienen Patientenserum als Antikörperquelle. Dabei muß zuerst geklärt werden, ob die Serum Antigene aus Nierenkarzinomen überhaupt erkennen können. Hierzu werden Immundoppeldiffusion und Gegenstromelektrophorese benutzt.

Die beiden Methoden bieten Aussicht auf Isolierung von Immunpräzipitaten und damit auch der an ihnen beteiligten Antigene, um sie anschließend weiter biochemisch charakterisieren zu können. Bei der Gegenstromelektrophorese, deren Empfindlichkeit etwa 10mal größer ist als die der Immundoppeldiffusion (Stites 1982), bewegt sich das Antigen auf Grund seiner negativen Ladung in Richtung Anode, der Antikörper wandert auf Grund von Elektroendosmose in Richtung Kathode. Um dies zu ermöglichen, muß der isoelektrische Punkt des Antigens deutlich unter dem pH-Wert des Gelpuffers liegen, da es sich sonst wie der Antikörper in Richtung Kathode bewegt und beide nicht aufeinandertreffen. Der isoelektrische Punkt des Antikörpers muß in der Nähe des pH-Wertes des Gelpuffers liegen, um eine Elektroendosmose in Richtung Kathode zu ermöglichen. In der Regel sind die isoelektrischen Punkte von Antigen und Antikörper nicht oder nur ungefähr bekannt. Es ist deshalb möglich, daß sie die oben geforderten Voraussetzungen nicht erfüllen und so trotz der größeren Empfindlichkeit dieser Methode nicht entdeckt werden können.

Die Immundoppeldiffusion ist in sofern universeller anwendbar, da bei Antigen und Antikörper nur die gleichmäßige Diffusion ins Gel vorausgesetzt wird. In der Gegenstromelektrophorese treten öfter Spontanpräzipitate nahe der kathodischen Seite der Auftragestelle des Antiserums auf. Sie können die Beurteilung spezifischer Immunpräzipitate erschweren. Während bei der Gegenstromelektrophorese ein Vergleich

verschiedener Immunpräzipitate schwierig ist, kann bei der Immundoppeldiffusion eine Aussage darüber gemacht werden, ob gleiche, ähnliche oder verschiedene Antigene an der Reaktion beteiligt sind. Bei beiden Methoden muß wegen der geringeren Empfindlichkeit im Vergleich zu radioimmunologischen, fluoreszenzimmunologischen oder enzymgekoppelten immunologischen Methoden relativ häufig mit falsch negativen Befunden gerechnet werden. Zudem stellt die Präzipitation einen komplexen Vorgang dar. Bei ihr wirken neben Antigen und Antikörper weitere noch unbekannte Kofaktoren aus dem Serum mit. So zeigen reine Immunglobulin G Lösungen oft nur geringe oder keine Präzipitate. Diese Kofaktoren dürfen bei der Immunglobulinfraktion-Herstellung nicht entfernt werden und müssen in der Gegenstromelektrophorese mit den präzipitierenden Antikörpern wandern (Crowle 1973). Antigen-Antikörper-Komplexe können sich in einem schmalen Bereich des Gels ansammeln und aus ihm wegen ihrer Größe nicht mehr herausdiffundieren, ohne daß sie ein sichtbares Präzipitat bilden. Seine Ausbildung kann dann etwa durch das Einlegen in Leitungswasser oder eine Cadmiumchloridlösung bewirkt werden (Crowle 1973).

Zwischen Antigen und Antikörper ist ein bestimmtes Konzentrationsverhältnis notwendig, da sonst die Antigen-Antikörper-Komplexe löslich bleiben. Das optimale Konzentrationsverhältnis aber auch die Konzentration von Antigen und Antikörper in den Proben ist normalerweise unbekannt. Solange nicht einer von beiden Reaktionspartnern in reiner Form isoliert werden kann, muß das richtige Verhältnis über Verdünnungsreihen ermittelt werden. Wegen des nur in begrenztem Maß zur Verfügung stehenden Materials konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht in nötigem Umfang durchgeführt werden.

In der Literatur findet sich nur eine Arbeit, die mit der Immundoppeldiffusion präzipitierende Antikörper gegen Tumormoleküle bei einem Nierenkarzinom-

patienten nachweist. Er wurde allerdings vorher mit der Mikrosomenfraktion eines homologen Nierenkarzinoms immunisiert (Nairn e. a. 1963). Keine Angaben finden sich über die Anwendung der Gegenstromelektrophorese bei der Suche nach tumorassoziierten Antigenen beim Nierenkarzinom. Sie wird jedoch bei der Suche nach Antikörpern gegen onkofetale Antigene eingesetzt (Kohn 1970, Wilms 1980).

In der vorliegenden Arbeit können mit den beiden Methoden in Seren von Nierenkarzinompatienten Antikörper gegen ihren Tumor gefunden werden, und es zeigt sich, daß auch in homologen Seren von Nierenkarzinompatienten Antikörper vorhanden sind, die Proteine aus Nierenkarzinomen präzipitieren können. Gelegentlich finden sich solche Antikörper auch bei gesunden Probanden.

Die Gegenstromelektrophorese zeigt sich dabei der Immundoppeldiffusion überlegen. Mit ersterer können in mehr Seren präzipitierende Antikörper gegen Antigene aus karzinombefallenen Nieren nachgewiesen werden. Auffällig ist, daß die Seren oft deutlicher gegen Proteinproben aus dem Normalanteil reagieren. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

Bei der makroskopischen Aufteilung werden bereits vom Tumor infiltrierte Bezirke dem Normalanteil zugeordnet. Die größere Menge an Tumorantigenen wäre aber dann trotzdem noch im Tumoranteil vorhanden und er müßte deutlicher mit den Seren reagieren.

Homologe Seren präzipitieren aus dem Normalnierenanteil Antigene (etwa Individualantigene), die im Tumoranteil in geringerer Konzentration vorhanden sind (Nairn e. a. 1966, Sarosdy u. Lamm 1982). Dagegen spricht, daß auch autologe Seren mit Proteinproben aus dem Normalanteil reagieren.

Zellen aus dem Normalanteil weisen schon die gleichen Antigene wie Tumorzellen auf. Dies würde be-

deuten, daß sie von Tumorzellen "infiziert" wurden, oder daß die den tumorauslösende Ursache auf alle Nierenzellen einwirkte und sie veranlaßte, neue Antigene zu bilden, ohne daß sie sich alle in Tumorzellen verwandelten. Für beide Hypothesen gibt es jedoch keine Hinweise.

Die Niere nimmt wegen ihrer Filterfunktion eine gesonderte Stellung ein. In ihr können sich bei Tumorträgern zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe ablagern (Theofilopoulos u. Dixon 1979). In diesem Fall würde es sich um tumorassoziierte Antigene aus Nierenkarzinomen und die entsprechenden Antikörper handeln. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können Immunglobuline extrazellulär vor allem in den Glomeruli des Normalanteils eines Nierenkarzinoms nachgewiesen werden (Nairn e. a. 1963). Ein dazugehörendes Antigen wird aber in dieser Arbeit nicht beschrieben. Langvad isoliert aus Nierenkarzinomen Immunglobuline, koppelt sie an die Oberfläche einer Perfusionskammer und isoliert damit aus dem Blut von Nierenkarzinompatienten tumorassoziierte Proteine (Langvad e. a. 1975). Die Ergebnisse beider Arbeiten unterstützen die Ansicht, daß Proteinproben aus dem Normalnierenanteil deshalb mit autologen Seren von Nierenkarzinompatienten reagieren, weil in ihnen durch Filtration von Antigen-Antikörper-Komplexen tumorassoziierte Antigene angereichert sind.

Um über die Tumorassoziation der Antigene aus den Immunpräzipitaten eine Aussage machen zu können, müßte untersucht werden, ob in den homologen Seren Antikörper gegen Individualantigene, etwa den HLA-Komplex, vorhanden sind. Diese müßten gegebenenfalls zuerst eliminiert werden. Die Identität der antigenen Determinanten, die von verschiedenen Seren erkannt werden, kann nur in einem kompetitiven Hemmtest nachgewiesen werden. Man müßte also Nierenkarzinommaterial mit einem Serum, dessen positive Reaktion bekannt ist, inkubieren und messen, ob die Reaktion eines 2. positiven Serums dadurch gehemmt wird. Untersuchungen dieser Art sind bei Nierenkarzinomen bisher nicht beschrieben worden.

Neben der quantitativen Aussage, daß Patientenserum Antigene aus Nierentumorzellen erkennen können gibt es auch Untersuchungen über die Titerhöhe der Antikörper. Kurz nach der operativen Entfernung des Tumors ist der Antikörpertiter am höchsten (Harding e. a. 1982). Damit würde auch die Beobachtung übereinstimmen, daß bei Patient 15 in der vorliegenden Arbeit präoperativ keine Antikörper gegen Proteinextrakte aus einem Nierenkarzinom gefunden wurden, dagegen nach der Operation in der Immundoppeldiffusion Präzipitate nachweisbar waren. Der Antikörpertiter erreicht seinen Höhepunkt erst in der 3. Woche, 15Se3 reagiert positiv 15Se2 dagegen eine Woche nach der Operation gewonnen zeigt noch keine Reaktion. In der zitierten Arbeit erreichen die Seren schon in der ersten Woche ihren höchsten Antikörpertiter, der dann wieder abfällt.

Bei Patienten, bei denen kein Wiederauftreten des Tumors nach der Operation beobachtet wird, nimmt der Titer in den folgenden Monaten ständig ab. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorwachstum und Metastasen ist der Titer relativ niedrig, oder es sind keine Antikörper zu finden (De Kernion e. a. 1979).

In Tab. 5.1. sind bisher erschienene Arbeiten über serologische Untersuchungen der Immunogenität von Nierenkarzinomen zusammengefaßt. Zum Teil sind die Antigene näher charakterisiert.

Absorptionsstudien im autologen System, wo allogene Faktoren nicht stören, zeigen, daß Seren von Nierenkarzinompatienten Antikörper gegen 3 verschiedene Gruppen von Antigenen enthalten können:

1. Antigene, die nur auf autologen Tumorzellen vorhanden sind;
2. Antigene, die sich auf verschiedenen Nierenkarzinomzelllinien, aber auch auf Zellen anderer Tumoren wie Melanom und Astrozytom befinden;
3. Antigene, die fast alle Zellen gemeinsam haben (Ueda e. a. 1979).

Tab. 5.1. Zusammenfassung der Arbeiten, in denen Nierenkarzinomantigene serologisch untersucht wurden

Autoren	Methoden	Antigenquellen	Antiseren	Bemerkungen
Nairn R. C. e. a. 1963	Immundoppel- diffusion	mikrosomale Frak- tion eines NK u. NN Seren	homologe Antiseren	vgl. Text
Duret P. H. 1967	Immunelektro- phorese	NK u. NN-Extrakt	heterologe Antiseren	Immunpräzipitat tritt nur gegen Nierentumorextrakt auf
Ravitz G. e. a. 1972	indirekte Immun- fluoreszenz	Gefrierschnitte Äther-Alkohol-Fix. von NK	homo-auto- loges Seren	keine Kreuzreaktion der 5 unter- suchten Patienten mit homologen Tumoren
Cummings K. B. e. a. 1974	komplementab- hängige humorale Zytotoxizität	Nierenkarzinom- zellen aus Zell- kultur	homologe Seren	6 von 14 NK-Patienten positiv 1 von 5 Gesunden positiv autolog negativ
Hakala T. R. e. a. 1974	komplementab- hängige humorale Zytotoxizität	NN- u. NK-Zellen aus Zellkultur	homologe u. autologe Seren	Zytotoxizität überwiegt bei Tumorträgern
Ackermann R. 1975	indirekte Immun- fluoreszenz	NK-Gefrierschnitte	homologe Seren	8 von 27 NK-Patienten positiv
Langvad E. e. a. 1975	Laurell-Immun- elektrophorese	aus Blut v. Patien- ten m. immobilisier- ten Antikörpern aus NK-Homogenat gewon- nene, absorbierte Proteine	heterologe Antiseren	es werden bei NK-Patienten 3 von Serumproteinen verschiedene Proteine nachgewiesen

Tab. 5.1. Fortsetzung

Autoren	Methoden	Antigenquellen	Antiseren	Bemerkungen
De Kernion J. B. e. a. 1979	Komplementbindungstest	NK-Zellen aus Zellkultur u. NN-Zellen direkt aus Organ	homologe Seren	6% falsch negativ, 20% positiv bei Gesunden, 20 - 77% positiv bei anderen Tumoren, Korrelation zw. Tumorstadium u. Titer
Ghose T. e. a. 1979	indirekte Immunfluoreszenz	NK-Zellen aus Zellkultur u. Gefrierschnitte	heterologe Antiseren absorbiert	Gefrierschnitte von 21 von 22 Patienten zeigen positive Immunfluoreszenz
Leblank P. A. e. a. 1979	Protein A Assay	2 NK Zelllinien	homologe Seren	41% u. 59% der Patienten positiv 10% u. 15% Gesunde positiv
Ueda R. e. a. 1980	*MHA, C3-MHA, IA, PA §	NK- u. NN-Zelllinien	autologe Seren	Unterteilung von NK-Antigenen in 3 Gruppen
Cocchiara R. e. a. 1981	Komplementbindungstest	100.000 x g Überstand v. 1 ultraschallbehandeltem NK	anti-HSV Seren v. Kaninchen	Nachweis u. Reinigung eines HSV assoziierten Antigens im menschl. NK
Ueda R. e. a. 1981	Immunpräzipitation m. Protein A	aus NK Zelllinien mit NP 40 gelöst Glykoproteine	monoklonale Antikörper v. mit NK-Zellen immun. Mäusen	Unterteilung von NK-Antigenen in 3 Gruppen

* mixed hemadsorption assay, anti-C3 mixed hemadsorption assay, immune adherence assay, protein A assay

Tab. 5.1. Fortsetzung

Autoren	Methoden	Antigenquellen	Antiseren	Bemerkungen
Harding M. e. a. 1982	indirekte Immun- fluoreszenz	Gefrierschnitte von NK	homologe u. autologe Seren	25 NK-Patienten haben Antikörpertiter zw. 10^{-3} u. 10^{-5} Gesunde 1:10 - 1:30
Hess H. e. a. 1983	indirekte Immun- fluoreszenz	Gefrierschnitte von NK u. NN	monoklonale Antikörper gegen Plasmamembranfraktion eines NK	Unterscheidung von gewebspezifischen Antigenen in NK u. NN
Jürgenliemk J. e. a. 1983	indirekte Immun- fluoreszenz	Gefrierschnitte von NK u. NN	monoklonale Antikörper gegen Plasmamembranfraktion eines NK	Charakterisierung von Antigenen die nur in NK zu finden sind u. Antigenen in NK u. NN

Zwei Gruppen, Falkenberg und Old, benutzen monoklonale Antikörper, um die Eigenschaften der Antigene auf Nierenkarzinomzellen näher zu bestimmen. Falkenberg und seine Mitarbeiter immunisieren Mäuse mit einer Plasmamembranfraktion und untersuchen mit den anschließend hergestellten monoklonalen Antikörpern Gefrierschnitte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. Sie kommen zu folgenden Ergebnissen.

Verschiedene histologische Strukturen wie proximaler Tubulus, interstitielles Gewebe oder Gefäße lassen sich auf Grund verschiedener Antigene unterscheiden. Diese sind alle auch auf Tumorzellen nachweisbar. Daneben finden sich Antigene, die nur auf Nierentumorzellen vorkommen, jedoch eine Abhängigkeit ihrer Verteilung von der histologischen Einordnung des Tumors aufweisen (andere Tumorarten werden nicht zum Vergleich herangezogen). Ein Zusammenhang mit fetalen Antigenen oder eine signifikante antigene Ähnlichkeit mit proximalem Tubulusepithel, die die Annahme, daß Nierenkarzinome aus diesen Zellen entstanden sind, bestätigen würde, ist nicht nachweisbar (Hess e. a. 1983, Jürgenliemk e. a. 1983, Mauck e. a. 1983 u. Falkenberg e. a. 1981).

Old hat dagegen gezeigt, daß Antigene des proximalen Tubulusepithels in vielen Fällen auch auf Nierentumorzellen zu finden sind (Bander e. a. 1983).

Seine Gruppe immunisiert mit in Kultur gewachsenen Zellen. In einer ihrer Arbeiten werden mit den gewonnenen monoklonalen Antikörpern durch Nonidet-P-40 gelöste Proteine untersucht. Sie isoliert die Antigen-Antikörper-Komplexe mit Protein A und trennt sie in IFPAG und SDS PAGE auf. Dabei findet sie mehrere Antigene. Sie sind zum Teil elektrophoretisch charakterisierbar. Old unterteilt sie in 3 Gruppen:

1. Antigene, die nur auf Nierentumoren, normalen und fetalen Nieren vorkommen;

2. Antigene, die Nierenkarzinomzellen mit einer großen Anzahl anderer Tumoren gemeinsam haben;
3. Antigene, die sich auf allen menschlichen Zellen finden.

Nierenkarzinomspezifische Antigene sind in dieser Untersuchung nicht entdeckt worden (Ueda e. a. 1981).

Mit monoklonalen Antikörpern läßt sich jede antigene Determinante einzeln darstellen und definieren. Dadurch kommt eine große Vielzahl von Antigenen zum Vorschein, die von herkömmlichen polyklonalen Antisera als ein Antigen erkannt werden, da sich in ihnen die einzelnen gegen verschiedene Determinanten gerichteten Antikörperklone nicht voneinander trennen lassen.

Trotz aller bisherigen Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern bleibt offen, ob ein Nierenkarzinomspezifisches Antigen existiert (Moon e. a. 1983). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß in Mäusen, die zur Herstellung der monoklonalen Antikörper verwendet werden, keine Immunantwort gegen spezifische Nierenkarzinomantigene hervorgerufen werden kann. Des weiteren könnte die Erkennung der antigenen Determinante durch einen monoklonalen Antikörper von der Aufbereitung des Tumormaterials abhängig sein. Da er nur eine antigene Determinante auf dem Molekül erkennen kann, reagiert er sehr empfindlich gegenüber Veränderungen im Molekül, die durch die Aufbereitungsart eintreten können, wenn sie diese Determinante betreffen.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mit Hilfe autologer und homologer Antisera Antigene aus Nierenkarzinomen zu präzipitieren, zu isolieren und ihr Molekulargewicht zu bestimmen. Dabei werden 2 verschiedene Wege eingeschlagen:

- a. In der ersten Dimension werden Proteinproben elektrophoretisch aufgetrennt. In der zweiten Dimension wandern sie in ein antiserumhaltiges Agarosegel ein. Dort reagieren sie mit Antikörpern und präzipitieren. Bei der SDS PAGE in der ersten Dimension filtriert man das störende

SDS in einer Lubrolschicht heraus (Converse u. Papermaster 1975). Präzipitate von Antigenen aus Nierenkarzinomen mit Antiseren sind mit dieser Methode nur sehr unsicher nachgewiesen worden. Möglicherweise beeinflusst das SDS irreversibel die Antigenität der Proteine. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wäre die zu geringe Empfindlichkeit. IEF beeinflusst antigene Strukturen der Proteine nicht und scheint deshalb für die nachfolgende immunologische Untersuchung geeigneter. In der Immunelektrophorese lassen sich zwar Präzipitate von Proteinproben mit Seren nachweisen, sie liegen aber auf der kathodischen Seite des IEF Gels. Obwohl sie eine gewisse Spezifität aufweisen - bei leeren IEF Gelen oder bei Agarosegelen ohne Serum sind keine Präzipitate nachweisbar - bleibt unklar, ob es sich tatsächlich um Immunpräzipitate handelt.

b. Immunpräzipitate werden isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Verfahren ähnelt im Prinzip dem von Ueda (Ueda e. a. 1981). Die Empfindlichkeit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode ist jedoch wesentlich geringer. Wegen der fehlenden radioaktiven Markierung der Antigene wird eine große Menge an Immunpräzipitat benötigt. Die Spontanpräzipitation von Immunkomplexen findet nur in einem relativ engen Konzentrationsbereich statt. Eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit läßt sich durch die Verwendung von Protein A erreichen. Protein A bindet Immunglobulin G (mit Ausnahme von Immunglobulin G3) über Fc-Rezeptoren und bildet an Sepharose gekoppelt ein ideales Immuno-adsorbens zur Isolierung von Antigen-Antikörper-Komplexen (Kronvall e. a. 1970, Kessler 1975). Gleiches Molekulargewicht antigener Komponenten sagt jedoch noch nichts über ihre Identität aus. So zeigt Ueda, daß mit einem monoklonalen Antikörper eine 120000 Dalton Komponente isoliert werden kann, die sich auf mehreren Zellarten findet. Mit einem 2. monoklonalen Antikörper läßt sich aus der 120000 Dalton Komponente eine Untergruppe von Molekülen isolieren, die nur auf Nierenzellen

zu finden sind. Diese Moleküle tragen 2 verschiedene antigene Determinanten. Die eine wird vom ersten monoklonalen Antikörper erkannt, die andere vom zweiten (Ueda e.a. 1981). Dieses Beispiel zeigt die Notwendigkeit von immunologischer u n d biochemischer Charakterisierung von Antigenen.

Faßt man die beim Nierenkarzinom bisher durchgeführten immunologischen Untersuchungen zusammen, so lassen sie sich in 3 Gruppen einteilen:

1. Antigene von Nierenkarzinomen werden mit xenogenen Antisera und xenogenen monoklonalen Antikörpern untersucht. Immunologische Methoden dienen hier als sehr empfindliches Instrument. Mit ihnen wird versucht, Merkmale, die nur Nierenkarzinomzellen zu eigen sind und sie von anderen Tumorzellen oder normalen Zellen unterscheiden, zu eruieren. Das Ziel ist dabei letztlich, sie diagnostisch (Ghose e.a. 1980) oder therapeutisch (Tykkä e.a. 1978, Mc Cune e.a. 1981, De Kernion 1983) zu nutzen. Über ihre Relevanz in der immunologischen Auseinandersetzung des Organismus mit dem Tumor läßt sich zunächst nichts aussagen.

2. Im Gegensatz dazu lassen sich bei der Untersuchung nierenkarzinomassoziierter Proteine mit autologen Patientensera Antigene nachweisen, die vom Organismus als fremd erkannt worden sind und sich deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit von Normalantigenen unterscheiden. Gemeinsame nierenkarzinomassoziierte Antigene verschiedener Tumorträger werden postuliert, wenn auch in homologen Patientensera Antikörper gegen sie gefunden werden. Ihre Isolierung und nähere biochemische Charakterisierung ist bisher wie auch in der vorliegenden Arbeit nicht befriedigend gelungen.

3. Antigene Komponenten rufen eine zelluläre Immunantwort im Tumor hervor. Eine Reihe von Untersuchungen weist dies beim Nierenkarzinom nach (Ackermann 1979, Elhilali u. Nayak 1975, Bubenik e.a. 1971, Bichler e.a. 1975). Mikrozytotoxizitätstest, Lymphozytenstimulation und Leukozytenmigrationstest sind dabei die am häufigsten angewand-

ten in vitro Methoden zum Nachweis der zellulären Immunabwehr. Während im Mikrozytotoxizitätstest Tumorzellen aus der Zellkultur als Antigen dienen, werden bei den beiden anderen Methoden vornehmlich Extrakte aus Nierenkarzinomen z. B. 1.000 x g Überstand (Kjaer 1974) zur Stimulation der immunkompetenten Zellen benutzt. Es zeigt sich, daß bei einer Anzahl von Nierenkarzinompatienten Lymphozyten gegen Nierenkarzinome nicht aber gegen normales Nierengewebe reagieren im Gegensatz zu tumorfreien oder andere Tumoren tragenden Probanden, wo dies nur selten der Fall ist. Allein Montie findet keinen Unterschied zwischen Gesunden und Tumorträgern (Montie e. a. 1976). Mit Fortschreiten der Metastasierung nimmt die zelluläre Immunreaktion ab. Werden die in diesen Versuchen benutzten Leukozyten gewaschen, so zeigen sie wieder eine positive Reaktion. Die Natur des dabei entfernten Faktors ist unbekannt (Kjaer 1976 a, b). Die Isolierung der Antigene, die an zellulären Immunreaktionen beteiligt sind, ist schwierig. Es gibt kein Immunoadsorbens wie im humoralen System, mit dessen Hilfe sie isoliert werden könnten. Nur durch eine möglichst weitgehende Auftrennung der Tumorproteine und die anschließende Testung der einzelnen Fraktionen könnte ihre Isolierung gelingen. So ist der KCl Extrakt eines Nierenkarzinoms in PAA Gelen aufgetrennt worden. Gegen Proteine aus einer Fraktion etwas unterhalb der Albuminbande findet man eine erhöhte Reaktion der Leukozyten von Nierenkarzinompatienten im Leukozytenmigrationstest (Wright e. a. 1977).

Es gilt als gesichert, daß eine immunologische Auseinandersetzung des Tumorträgers mit seinem Tumor stattfindet. Obwohl in jüngster Zeit viele verschiedene Antigene in Nierenkarzinomzellen nachgewiesen worden sind, läßt sich nicht sagen, ob es ein gemeinsames Nierenkarzinom assoziiertes oder Nierenkarzinom spezifisches Antigenmuster gibt. Erst weitere Erkenntnisse in der Immunologie, der Tumorbilogie und vor allem der Molekulargenetik sind nötig, um die antigenen Veränderungen

verstehen und die komplexen, oft widersprüchlichen Ergebnisse richtig einordnen zu können.

6. A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

A30	: Stammlösung zur Herstellung von Polyacrylamidgelen : 30 g Acrylamid 0,8 g Bismethylacrylamid 100 ml H ₂ O
APS	: Ammoniumpersulfat
BH ₂ S ₁	: lösliche Proteine aus einem Melanom
BSA	: Rinder-Serum-Albumin
Cyt C	: Cytochrom C
E ₅₉₅	: Extinktion gemessen bei 595 nm Wellenlänge
EDTA	: Äthylendiamin-Tetraessigsäure
g	: Fallbeschleunigung (9,81 m sec ⁻²)
IEF	: Isoelectric focusing
IFPAG	: Isoelectric focusing in Polyacrylamidgel
Ig	: Immunglobulinfraktion
M	: Mol/Liter
N	: Normalanteil einer karzinombefallenen Niere
NN	: gesunde Niere
PAA	: Polyacrylamid
PBS	: phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7,2 : 8,1 g NaCl 0,862 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,248 g KH ₂ PO ₄ 1.000 ml Aqua bidest.
S	: Sediment beim differentiellen Zentrifugieren
SDS	: Natriumdodecylsulfat
SDS PAGE	: Polyacrylamidgelelektrophorese mit SDS
Se	: Serum
STED	
Puffer	: Homogenisationspuffer : 0,25 M Saccharose 10 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 2 mM Dithiothreitol pH 7,6
T	: Tumoranteil einer karzinombefallenen Niere

TCA : Trichloressigsäure
TEMED : tetramethylethylenediamine
Tris : Trishydroxymethylaminomethan
Ü : Überstand beim differentiellen Zentrifugieren
Upm : Umdrehungen pro Minute
v/v : volume/volume
X100 : PBS + 0,5% Triton-X-100

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Ackermann R. Tumor-associated antibodies against renal cell carcinomas detected by immunofluorescence. Eur. Urol. 1, 154-156, 1975
- 2 Ackermann R. Immunologic aspects of malignant renal disease. in : Renal and Adrenal Tumors, ed.:Löhr E., 248-257, Springer Berlin 1979
- 3 Adams D.O., Gilbert R.W. u. Bigner D.D. Cellular immunity in rats with primary brain tumors - inhibition of macrophage-migration by soluble extracts of avian-sarcoma virus-induced tumors. J. Natl. Cancer Inst. 56, 1119-1123, 1976
- 4 Adolfsson G. Regression of hypernephroma. Urol. Int. 21, 365-374, 1966
- 5 Albino A.P., Strange R.L., Oliff A.I., Furth M.E. u. Old L.J. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity. Nature 308, 69-72, 1984
- 6 Allen R.C. u. Maurer H.R. Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel; advances of methods and theories, biochemical and clinical applications. De Gruyter Berlin New York, 1974
- 7 Bander N.H., Whitmore W.F. u. Old L.J. Monoclonal antibody defined cell surface antigens of human renal cancer. Presented at the 78th annual meeting, American Urological Association, Las Vegas, Nevada, April 18-21, 1983; zit. n.:Moon T.D. e.a. 1983
- 8 Belitsky P., Ghose T., Aquino J., Tai J. u. Mc Donald A.S. Radionuclide imaging of metastases from renal-cell carcinoma by ¹³¹I labeled antitumor antibody. Radiology 126, 515-517, 1978
- 9 Benjamini E., Rennick D.M. u. Sell S. Tumor immunology. In:Basic & Clinical Immunology ed.:Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H. u. Wells J.V., Lange, 233-249, Los Altos 1982

- 10 Bichler K.H., Ax W. u. Tautz C.H. Cell-mediated immunity in patients with renal adenocarcinoma. Eur. Urol. 1, 231-234, 1975
- 11 Bubenik J., Jakoubkova J., Krakora P., Baresova M., Helbich B., Viklicky V. u. Malaskova V. Cellular immunity to renal carcinomas in man. Int. J. Cancer 8, 503-513, 1971
- 12 Cikes M. Variations in expression of surface antigens on cultured cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 177, 190-195, 1971
- 13 Cocchiara R., Tarro G., Flaminio G., Di Gioia M., Smeraglia R. u. Geraci P. Purification of herpes simplex virus tumor associated antigen from human kidney carcinoma. Cancer 46, 1594-1601, 1980
- 14 Converse C.A. u. Papermaster D.S. Membran protein analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. Science 189, 469-472, 1975
- 15 Cooper G.M. Cellular transforming genes. Science 218, 801-806, 1982
- 16 Crowle A.J. Immunodiffusion. 2nd ed., Acad. Press New York London, 1973
- 17 Crumpton M.J.u. Parkhouse R.M.E. Comparison of the effects of various detergents on antigen-antibody interaction. FEBS Lett. 22, 210-212, 1972
- 18 Cummings K.B., Peter J.B. u. Kaufman J.J. Cell-mediated immunity to tumor antigens in patients with renal cell carcinoma. J. Urol. 110, 31-35, 1973
- 19 Cummings K.B., Peter J.B. u. Kaufman J.J. Cytotoxic serum factors in patients with renal cell carcinoma. J. Urol. 111, 330-333, 1974
- 20 Daly J.J., Prout G. R., Ahl C.A. u. Lin J.C. Specificity of cellular immunity to renal cell carcinoma. J. Urol. 111, 448-452, 1974
- 21 Davis B.J. Disc electrophoresis; 2. method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-409, 1964

- 22 De Giorgi L.S. Regression of pulmonary metastases during radiation to hypernephroma (immunity and cancer). Cancer 30, 895-899, 1972
- 23 De Kernion J.B. Treatment of advanced renal cell carcinoma-traditional methods and innovative approaches. J. Urol. 130, 2-7, 1983
- 24 De Kernion J.B.,
Rumming K.P. u.
Gupta R.K. The detection and clinical significance of antibodies to tumor-associated antigens in patients with renal cell carcinoma. J. Urol. 122, 300-305, 1979
- 25 Deweerd J.H.,
Hawthorne N.J. u.
Adson M.A. Regression of renal hepatic metastasis following removal of primary lesions. J. Urol. 117, 790-792, 1977
- 26 Duret Ph. u.
Burtin P. Mise en évidence dans les cancers rénaux d'un antigène non présent dans le rein normal humain. Eur. J. Cancer 3, 237-238, 1967
- 27 Elhilali M.M. u.
Nayak S. Immunologic evaluation of human renal cell carcinoma. Invest. Urol. 13, 60-66, 1975
- 28 Everson T.C. Spontaneous regression of cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 114, 721-735, 1964
- 29 Falkenberg F.W.,
Müller E.,
Riffelmann H.D.,
Behrendt B. u.
Waks T. The production of monoclonal antibodies against glomerular and other antigens of the human nephron. Renal Physiol. 4, 150-156, 1981
- 30 Ghose T.,
Belitsky P.,
Tai J. u.
Janigan D.T. Production and characterization of xenogeneic antisera to a human renal cell carcinoma-associated antigen. JNCI 63, 301-308, 1979
- 31 Ghose T.,
Norvell S.T.,
Aquino J.,
Belitsky P.,
Tai J.,
Guclu A. u.
Blair A.H. Localization of ¹³¹I-labeled antibodies in human renal cell carcinomas and in a mouse hepatoma and correlation with tumor detection by photoscanning. Cancer Res. 40, 3018-3026, 1980
- 32 Gordon A.H. Electrophoreses of proteins in polyacrylamide and starch gels. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology ed.: Work T.S. and Work E. vol. 1, 1-149, North Holland publishing Company Amsterdam London, 1969

- 33 Gross L. Importance of dosage in intradermal immunization against transplantable neoplasms. *Cancer Research* 3, 770-778, 1943
- 34 Hämmerling G. Histocompatibility antigens and tumor metastases. Vortrag im Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München am 20.01.1984
- 35 Hakala T.R., Castro A.E., Elliott A.Y. u. Fraley E.E. Humoral cytotoxicity in human renal cell carcinoma. *Invest. Urol.* 11, 405-410, 1974
- 36 Harding M., Breul J., Liemk I.J., Hertle L., Tunn U., Senge T., Binder A. u. Falkenberg F.W. A sensitive test system for detection and quantitation of antibodies against structures of renal adenocarcinoma in sera of tumor patients. *Immunobiol.* 162, 358-359, 1982
- 37 Hemstreet G.P.III, Wittliff J.L., Sarraf A.M., Hall M.L.III, Mc Rae J. u. Durant J.R. Comparison of steroid receptor levels in renal-cell carcinoma and autologous normal kidney. *Int. J. Cancer* 26, 769-775, 1980
- 38 Hellström K.E. u. Brown J.P. Tumor antigens. In: The Antigens, ed.: Sela M., 5, 2-82, Acad. Press, New York, 1979
- 39 Hess H., Scherberich J.E., Mauck J., Falkenberg F. u. Heinert G. Immunohistological characterization of human renal adenocarcinoma applying monoclonal antitumor antibodies. *Immunobiol.* 165, 279, 1983
- 40 Hewitt H.B., Blake E.R. u. Walder A.S. Critique of evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33, 241-259, 1976
- 41 Irie K., Irie R.F. u. Morton D.C. Detection of antibody and complement complexed in vivo on membranes of human cancer cells by mixed hemadsorption techniques. *Cancer Res.* 35, 1244-1248, 1975

- 42 Jürgenliemk I., Senge T., Scherberich J.E. u. Falkenberg F.W. Detection of different morphological structures in human kidneys and kidney carcinomas by monoclonal antibodies. *Immunobiol.* 165, 288, 1983
- 43 Kaddish A.S., Marcus D.M. u. Bloom B.R. Inhibition of leukocyte migration by human breast-cancer-associated antigens. *Int. J. Cancer* 18, 581-586, 1976
- 44 Kessler S.W. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein a-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115, 1617-1624, 1975
- 45 Kjaer M. The capillary tube leukocyte migration technique (LMT) as a method for detection of serum inhibiting activity of tumor-directed, cellular hypersensitivity in patients with renal carcinomas. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B* 82, 294-296, 1974
- 46 Kjaer M. Prognostic value of tumor-directed, cell-mediated hypersensitivity detected by means of the leukocyte migration technique in patients with renal carcinoma. *Eur. J. Cancer* 12, 889-898, 1976a
- 47 Kjaer M. Effect of leukocyte washings on cellular immunity to human renal carcinoma. *Eur. J. Cancer* 12, 783-792, 1976b
- 48 Klein G. Tumor antigens. *Annu Rev. Microbiol.* 20, 223-242, 1966
- 49 Kohn J. Method for the detection and identification of α -fetoprotein in serum. *J. Clin. Path.* 23, 733-737, 1970
- 50 Kronvall G., Seal U.S., Finstad J. u. Williams R.C.Jr. Phylogenetic insight into evolution of mammalian fc fragment of G globulin using staphylococcal protein A. *J. Immunol.* 104, 140-147, 1970
- 51 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970
- 52 Langvad E., Hyden H., Wolff H. u. Kroeigaard N. Extracorporeal immunoabsorption of circulating specific serum factors in cancer patients. *Br. J. Cancer* 32, 680-692, 1975

- 53 Leblanc P.A.,
Taffet S.M.,
Fried F.A. u.
Avis F.P. Staphylococcal protein A assay for
detection of antibody directed at
renal cancer cells. J. Urol. 121,
724-727, 1979
- 54 Margolis J. A versatile gradient-generating device.
Anal. Biochem. 27, 319-322, 1969
- 55 Mauck J.,
Scherberich J.E.,
Hess H. u.
Falkenberg F. Oncodevelopmental studies on lectin recep-
tors and tissue epitopes recognized by
monoclonal antibodies against renal cancer.
Immunobiol. 165, 317-318, 1983
- 56 Maurer H.R. Disc electrophoresis and related techniques
of polyacrylamide gel electrophoresis.
De Gruyter Berlin New York, 1971
- 57 Mc Cune C.S.,
Patterson W.B. u.
Henshaw E.C. Active specific immunotherapy with tumor-
cells and corynebacterium parvum:a phase
I study. Cancer 43, 1916-1922, 1979
- 58 Mc Cune C.S.,
Schapira D.V. u.
Henshaw E.C. Specific immunotherapy of advanced renal
carcinoma:evidence for the polyclonality
of metastases. Cancer 47, 1984-1987, 1981
- 59 Mondorf A.W.,
Kinne R.,
Scherberich J.E. u.
Falkenberg F. Isolierung, enzymatische und immunologische
Charakterisierung einer Plasmamembranfrak-
tion vom proximalen Tubulus der menschlichen
Niere. Clin. Chim. Acta 37, 25-32, 1972
- 60 Montie J.E.,
Straffon R.A.,
Deodhar S.D. u.
Barna B. In vitro assessment of cell-mediated
immunity in patients with renal cell
carcinoma. J. Urol. 115, 239-242, 1976
- 61 Moon T.D.,
Vessella R.L. u.
Lange P.H. Monoclonal antibodies in urology.
J. Urol. 130, 584-592, 1983
- 62 Mukamel E.,
Bruhis S.,
Nissenkorn I. u.
Servadio C. Steroid receptors in renal cell carcinoma:
relevance to hormonal therapy. J. Urol.
131, 227-230, 1984
- 63 Nairn R.C.,
Ghose T. u.
Tannenberg A.E.G. Kidney specific antigen depletion in human
renal carcinomas. Br. J. Cancer 20,
756-760, 1966
- 64 Nairn R.C.,
Philip J.,
Ghose T.,
Porteous I.B. u.
Fothergill J.E. Production of a precipitin against renal
cancer. Br. Med. J. 1, 1704-1704, 1963

- 65 Nakano E., Autologous mixed lymphocyte tumor cell culture
Fujioaka H., in patients with renal cell carcinoma.
Ishibashi M., J. Urol. 131, 223-226, 1984
Matsuda M.,
Osafune M.,
Takaha M. u.
Sonoda T.
- 66 Oberling C., Ultrastructure of the clear cells in renal
Riviere M. u. carcinomas and its importance for the
Hagueneau F. demonstration of their renal origin.
Nature 186, 402-403, 1960
- 67 Ogata S.I., Comparison of ³H glucosamine-labeled
Ueda R. u. glycoproteins from human renal cancer
Lloyd K.O. and normal kidney epithelial cell cultures
by two-dimensional polyacrylamide gel
electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
78, 770-774, 1981
- 68 O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electropho-
resis of proteins. J. Biol. Chem. 246,
4007-4021, 1975
- 69 Ornstein L. Disc electrophoresis; 1. background and
theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321-327,
1964
- 70 Plowman G.D., Assignment of the gene for human melanoma-
Brown J.P., associated antigen p97 to chromosome 3.
Enns C.A., Nature 303, 70-72, 1983
Schröder J.,
Nikirmaa B.,
Sussman H.H.,
Hellström K.E. u.
Hellström E.
- 71 Prehn R.T. u. Immunity to methylcholanthrene induced
Main J.M. sarcoma. JNCI 18, 769-773, 1957
- 72 Ravitz G., Antibodies to human renal cell carcinoma.
Watne A.L. u. J. Urol. 107, 26-28, 1972
Milam D.F.
- 73 Richie J.P., Current treatment of metastatic renal cell
Steel G.D., carcinoma with xenogeneic immune ribonucleic
Wilson R.E., acid. J. Urol. 131, 236-238, 1984
Ervin T.,
Wang B.S. u.
Mannick J.A.
- 74 Roseberg S.A. Serologic analysis of human cancer antigens.
Academic Press New York 1980

- 75 Rowin G.L. Isolation of lysosomes. In:Subzellular Particles Structures and Organelles, ed.: Lashin A.I., Last J.A., Marcell Dekker New York, 90-109, 1974
- 76 Sarosdy M.F. u. Lamm D.L. Application of the mixed cell agglutination test for cellsurface antigens to renal cell carcinoma. J. Urol. 128, 693-696, 1982
- 77 Scherberich J.E., Falkenberg F.W., Mondorf A.W., Müller H. u. Pfleiderer G. Biochemical and immunological studies on isolated brush border membranes of human kidney cortex and their membrane surface proteins. Clin. Chim. Acta 55, 179-197, 1974
- 78 Shapiro A.L., Vinuela E. u. Maizel J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820, 1967
- 79 Slater G.G. Pore-limit electrophoresis on a gradient of polyacrylamide gel. Anal. Biochem. 24, 215-217, 1968
- 80 Snell G.D. The immunogenetics of tumor transplantation. Cancer Res. 12, 543-546, 1952
- 81 Steel G.Jr., Shang Wang B., Richie J., Wilson R.E., Ervin T., Yankee R., Fallon M. u. Mannick J.A. In vivo effect and parallele in vitro lymphocyte-mediated tumor cytolysis after phase I xenogeneic immune RNA treatment of patients with widesread melanoma or metastatic renal cell carcinoma. Cancer Res. 40, 2377-2382, 1980
- 82 Stites D.P. Clinical laboratory methods for detection of antigens & antibodies. In:Basic & Clinical immunology ed.:Stites D.P. Stobo J.D., Fundenberg H.H. & Wells J.V.,Lange, Los Altos, 325-365, 1982
- 83 Takasugi M. u. Klein E. A microassay for cell mediated immunity. Transplantation 9, 219-227, 1970
- 84 Theofilopoulos A.N. u. Dixon F.J. Immun complexes associated with neoplasia. In:Immunodiagnosis of Cancer, part II, ed.:Herberman R.B. u. Mc Intire K.R., 896-937, Deccer New York Basel, 1979

- 85 Tykkä H.,
Oravisto K.J.,
Sarna S.,
Lehtonen T. u.
Tallberg T. Active specific immunotherapy of advanced renal-cell carcinoma. Eur. Urol. 4, 250-258, 1978
- 86 Ueda R.,
Ogata S.I.,
Morrissey D.M.,
Finstad C.L.,
Szkudlarek J.,
Whitmore W.F.,
Oettgen H.F.,
Lloyd K.O. u.
Old L.J. Cell surface antigens of human renal cancer defined by mouse monoclonal antibodies: identification of tissue-specific kidney glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5122-5126, 1981
- 87 Ueda R.,
Shiku H.,
Pfreundschuh M.,
Takahashi T.,
Li L.T.C.,
Whitmore W.F.,
Oettgen H.F. u.
Old L.J. Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing. J. Exp. Med. 150, 564-579, 1979
- 88 Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Acta 257, 11-72, 1972
- 89 Warnatz H. Tumormmunologie.
Thieme Stuttgart 1975
- 90 Weber K. u.
Osborn M. Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 224, 4406-4413, 1969
- 91 Wilms K.,
Klausch B.,
Straube W.,
Hofmann R. u.
Linneke P. Überwanderungselektrophorese. In: Immunologische Arbeitsmethoden, hrsg.: Friemel H., 2. Auflage, 221-230, Fischer Stuttgart, 1980
- 92 Winter A.,
Ek K. u.
Andersson U.B. Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. LKB^R application note 250, 1977
- 93 Wolf H.,
Langvad E. u.
Hyden H. The clinical course in patients with renal carcinoma subjected to extra-corporeal immunoadsorption. Br. J. Urol. 53, 89-94, 1981

- 94 Wright G.L., Isolation of a soluble tumor-associated
Schellhammer P.F. u.antigen from human renal cell carcinoma
Faulconer R.L. by gradient acrylamide gel electrophoresis.
Cancer Res. 37, 4228-4232, 1977

Herrn Privatdozenten Dr. Dr. G. D. Birkmayer danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine Hilfe und seine Anregungen während sämtlicher Stadien meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Miller möchte ich herzlich danken, daß ich in den Räumen am Institut für Zellbiologie der Universität München arbeiten konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. C. Hammer und Herrn Prof. Dr. E. Schmiedt bedanke ich mich für das zur Verfügung gestellte Untersuchungsgut.

Mein besonderer Dank gilt Frau Käthe Rauert für die immer freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche sowie Frau Eva-Maria Praetorius für die Herstellung des umfangreichen Fotomaterials. Ebenso danke ich Frl. Monika Stiegelmayr, Frl. Maria Stiegelmayr und Frau Elisabeth Römer-Stiegelmayr für die Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes.

L E B E N S L A U F

12. Mai 1952 geboren in Augsburg als erstes von neun
Kindern des Zahnarztes Alois Stiegelmayr
und seiner Frau Theresia, geb. Angermaier;
- 1958 - 1971 Volksschule in Augsburg und Rhabanus
Maurus Gymnasium in St. Ottilien;
- 1971 Abitur;
- 1971 - 1977 Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München;
21. März 1977 Abschluß des Zahnmedizinstudiums mit
dem Staatsexamen;
30. Mai 1977 Bestallung als Zahnarzt;
- Mai 1977 - Ableistung des Grundwehrdienstes als
Juli 1978 Stabsarzt in Dörverden-Barme;
- seit Nov. 1978 Doktorand bei Privatdozent Dr. G. D.
Birkmayer am Institut für Zellbiologie
(Vorstand: Prof. Dr. F. Miller);
- Okt. 1978 - Assistent in der väterlichen Praxis;
Mai 1983
- Mai 1983 Niederlassung in Gemeinschaftspraxis
mit meinem Vater.

